

Universidade de Évora

Diversidade molecular em estirpes de *Pseudomonas savastanoi* isoladas de nódulos de *Olea europaea* L. portuguesa

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”

Petra Karina Morais Correia

Mestrado em Biologia das Pragas e Doenças de Plantas

Orientador – Professor Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro

Évora

2007

Universidade de Évora

**Diversidade molecular em estirpes de *Pseudomonas savastanoi*
isoladas de nódulos de *Olea europaea* L. portuguesa**



“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”

170 116

Petra Karina Morais Correia

Mestrado em Biologia das Pragas e Doenças de Plantas

Orientador – Professor Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro

Évora

2007

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Rogério Tenreiro, na qualidade de orientador desta dissertação, por me ter acolhido no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da FCUL, pela disponibilidade e acompanhamento na realização deste trabalho, pela partilha de conhecimentos, pelas críticas construtivas e, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação inerente a uma vida profissional tão preenchida.

Ao Professor Doutor Manuel Mota, por aceitar ser co-orientador desta dissertação, por me ter incentivado a fazer este Mestrado, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu na área da Fitopatologia e, por estar sempre disponível para solucionar os problemas que foram surgindo ao longo do percurso.

À Professora Doutora Ana Reis pela valiosa contribuição na área da Microbiologia, pelo constante incentivo, disponibilidade e carinho que dedicou durante a parte experimental deste trabalho.

À Sandra Casimiro, colega e amiga desde o início, pelo constante apoio principalmente nas alturas de desespero, fazendo com que eu encarasse as dificuldades de uma forma optimista e ainda, pela disponibilidade e preciosa ajuda na análise de sequências, sem a qual provavelmente este trabalho ainda não estaria concluído.

Ao Ivo, a enorme paciência que teve para me explicar de uma forma simples mas cientificamente correcta os fundamentos básicos da construção de filogenias e, pela ajuda e na utilização do software correspondente, que decidi utilizar na conclusão do trabalho experimental.

Aos meus colegas de laboratório, Abdou, António, Carlos, Carolina, Catarina, David, Elizabete, Helena Teixeira, Isabel, João, Libia, Liliana, Margarida Sousa, Ricardo, Sandra Chaves, Susana Santos, Susana Domingues, Tânia, Teresa, Tiago e Rita, o bom ambiente de laboratório que me proporcionaram, a paciência para as dúvidas, as sugestões, o companheirismo e a amizade que me dedicaram.

À Sandra Cruz, à Paula e à Sónia, pela disponibilidade e esforço por atenderem sempre aos meus pedidos para preparação e esterilização de material.

Ao Ricardo, meu marido, por ser tão companheiro, dedicado e compreensivo, pela ajuda que me deu nas tarefas diárias e nas traduções que precisei de fazer no

decorrer do Mestrado e na escrita da tese. Por ter ido comigo para Évora, tantas e tantas vezes, só para me fazer companhia durante a viagem na altura das aulas e dos exames e, por tantas outras razões que o papel não me chegaria para enumerar.

Ao meu irmão, que é a pessoa mais prestável e bem disposta que conheço, por me ter ajudado em tantas coisas, porque a “mana” não tem tempo para as fazer. Sempre curioso em saber o que é que eu faço no laboratório e, apesar de não ser uma área que domine sempre me incentivou e encorajou a caminhar em frente, se é mesmo isso que te faz feliz...

Finalmente, o meu mais profundo agradecimento aos meus pais, que me deram a oportunidade de chegar até aqui, a quem eu devo “tudo o que sou hoje” e, que continuam a apoiar-me incondicionalmente, pela compreensão, carinho, paciência e “ralhetes”, que no fundo demonstram o amor que sentem por mim.

**Diversidade molecular em estirpes de *Pseudomonas savastanoi*
isoladas de nódulos de *Olea europaea* L. portuguesa**

Resumo

Pseudomonas savastanoi provoca a doença dos nódulos de oliveira. Neste estudo aplicou-se uma abordagem polifásica na caracterização de isolados (produtores de IAA) obtidos a partir de nódulos de três variedades de oliveira. Aplicaram-se testes fenotípicos clássicos e moleculares, nomeadamente para detecção do gene *iaaL*, PCR-RFLPs do rDNA 16S e 'fingerprinting' genómico por BOX-, ERIC- e REP-PCR. Obteve-se uma grande heterogeneidade fenética entre isolados identificados como *P. savastanoi*. Recorreu-se à sequenciação do rDNA 16S e verificou-se que apenas um isolado apresentava homologia com *P. savastanoi*, sendo os restantes homólogos de *Pantoea agglomerans*, *Pantoea oleae* e *Erwinia toletana*, comprovando a falta de fiabilidade dos outros métodos de identificação utilizados. Ficou também claramente demonstrado que o gene *iaaL* associado à patogenicidade não é exclusivo de *P. savastanoi*, levantando a hipótese de esta espécie não ser a única responsável pelo aparecimento de nódulos em oliveira.

Palavras chave: *P. savastanoi*, doença dos nódulos de oliveira, IAA, abordagem polifásica.

Molecular diversity among strains of *Pseudomonas savastanoi* isolated from portuguese *Olea europaea* L knots

Abstract

Pseudomonas savastanoi causes a disease known as olive knot. In this study a polyphasic approach was applied for the characterization of strains (IAA producers) isolated from three varieties of olive trees. Both classic phenotypic and molecular tests were applied, in particular for detection of the *iaaL* gene, PCR-RFLPs of 16S rDNA and genomic fingerprinting using BOX-, ERIC- and REP-PCR. High fenetic heterogeneity was obtained among isolated strains identified as *P. savastanoi*. Sequencing of 16S rDNA revealed that only one isolated strain showed homology with *P. savastanoi*, while the remaining strains were homologous to *Pantoea agglomerans*, *Pantoea oleae* and *Erwinia toletana*, proving the lack of fidelity of the other identification methods used. It was also clearly demonstrated that *iaaL* gene associated with the disease is not exclusive of *P. savastanoi*, which suggests that this species is not the only one responsible for the "olive knot".

Key words: *P. savastanoi*, olive knot, IAA, polyphasic approach .

ÍNDICE

	pág.
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	IV
 I - Introdução	 1
1. A doença dos nódulos da oliveira	2
1.1. Características da doença	2
1.2. Incidência da doença em Portugal, em particular no Alentejo	3
1.3. Agente patogénico responsável	4
1.3.1. O género <i>Pseudomonas</i>	4
1.3.1.1. Diversidade	5
1.3.1.2. Evolução taxonómica do género <i>Pseudomonas</i>	7
1.3.1.3. A espécie <i>Pseudomonas savastanoi</i>	9
1.3.2. <i>Pseudomonas savastanoi</i>	11
1.3.2.1. Relação com o hospedeiro	11
1.3.2.2. Distribuição geográfica	11
1.3.2.3. Isolamento, identificação e patogenicidade	12
1.4. Epidemiologia	12
1.5. Métodos de controlo da doença	13
1.5.1. Métodos tradicionais	13
1.5.2. Métodos químicos e biológicos	14
1.6. Mecanismos de resistência à doença	15
1.6.1. Resistência passiva	15
1.6.2. Resistência activa	16
1.6.2.1. Compostos que afectam a capacidade de virulência	18
1.6.2.2. Fitotoxinas	19
1.6.2.3. Fitohormonas	19
2. Diversidade fenotípica e genómica em <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	23
3. Objectivos e plano estrutural do trabalho realizado	27
 II - Material e Métodos	 28
1. Isolamento de <i>P. savastanoi</i> através da recolha e processamento de nódulos de árvores sintomáticas	29
2. Caracterização fenotípica	31
3. Caracterização bioquímica	31
4. Produção de Ácido Indoleacético (IAA)	32
5. Extracção de DNA	32
5.1. Extracção de DNA total	32
5.1.1. Método do tiocianato de guanidina	32
5.1.2. Método de fervura	33

5.2. Extração de DNA plasmídico	34
6. Identificação a nível de género por PCR-RFLPs do rDNA 16S	35
6.1. PCR	35
6.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose	35
6.3. RFLPs	35
6.4. Observação dos produtos de RFLPs por electroforese em gel de agarose	35
7. Identificação a nível de espécie por PCR-RFLPs do gene <i>iaaL</i>	36
7.1. PCR	36
7.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose	36
7.3. RFLPs	36
7.4. Observação dos produtos de RFLPs por electroforese em gel de agarose	37
8. Identificação e confirmação dos isolados por Nested-PCR do gene <i>iaaL</i>	37
8.1. PCR	37
8.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose	37
9. Avaliação da diversidade genómica de isolados de <i>P. savastanoi</i> por BOX, ERIC e REP-PCR	38
9.1. PCR	38
9.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose	38
10. Sequenciação do rDNA 16S de alguns isolados de <i>P. savastanoi</i> e construção de uma árvore filogenética	39
10.1. PCR	39
10.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose	39
10.3. Purificação dos produtos de PCR	39
10.4. Sequenciação	39
10.5. Construção de uma árvore filogenética	40
 III – Resultados e discussão	 41
1. Identificação a nível de género através de testes fenotípicos	42
2. Identificação a nível de espécie através de testes bioquímicos	44
3. Produção de ácido indoleacético (IAA)	48
4. Identificação a nível de género por PCR-RFLPs do rDNA 16S	51
5. Identificação a nível de espécie por PCR-RFLPs do gene <i>iaaL</i>	53
6. Identificação e confirmação dos isolados por Nested-PCR do gene <i>iaaL</i>	56
7. Avaliação da diversidade genómica dos isolados de <i>P. savastanoi</i> por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR	58
8. Sequenciação do rDNA 16S de alguns isolados e construção de uma árvore filogenética	65
9. Análise de resultados face à sequenciação do gene rDNA 16S	70
 IV – Considerações finais e Perspectivas	 74
 V – Referências Bibliográficas	 80
 Anexos	 86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: ‘Galega Vulgar’ onde se observa o aparecimento de necrose com inchaço do caule.	pág. 3
Figura 2: ‘Cordovil de Serpa’ onde se observa o aparecimento de nódulos no caule, como resposta à infecção.	3
Figura 3: A – Morfologia de <i>Pseudomonas syringae</i> (http://genome.igi-psf.org/draft_microbes/images) B – Coloração Gram em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (http://www.mrcophth.com/pathology/selftests/pseudomonas.jpg) C – Fluorescência em <i>Pseudomonas fluorescens</i> (http://fvl.vfu.cz/sekce/sek_patob/1240/obrazkova_priloha/mikrob/img)	5
Figura 4: Mecanismos de resistência e susceptibilidade em plantas.	17
Figura 5: Via de produção de ácido indoleacético em <i>P. savastanoi</i> .	21
Figura 6: Produção de IAA (µg/ml) em isolados obtidos a partir de nódulos de oliveira e em estirpes de referenciado género <i>Pseudomonas</i> .	49
Figura 7: Perfis de restrição do gene rDNA 16S.	52
Figura 8: Gel de amplificação do gene <i>iaaL</i> .	55
Figura 9: Gel de restrição do gene <i>iaaL</i> .	56
Figura 10: Gel de amplificação do gene <i>iaaL</i> com os ‘primers’ F/R e re-amplificação com os ‘primers’ N1/N2 em estirpes de referência.	57
Figura 11: Gel de amplificação por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR.	59
Figura 12: Dendrograma Global obtido a partir dos perfis de BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR.	61
Figura 13: Esquema representativo da percentagem de homologia com base em sequências rDNA 16S.	67
Figura 14: Árvore filogenética construída com base nas sequências parciais de rDNA 16S dos isolados e de estirpes de referência da base de dados NCBI, utilizando o método de ‘neighbour joining’.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos filogenéticos do género <i>Pseudomonas</i> derivados de sequências rDNA 16S.	pág. 8
Tabela 2. Distribuição mundial dos patogéneos dos nódulos de oliveira.	12
Tabela 3. Estirpes tipo e de referência utilizadas nos testes fenotípicos e moleculares.	29
Tabela 4. Relação entre a origem de recolha das amostras e o número de colónias isoladas.	30
Tabela 5. Resultados das galerias API 20NE (50 isolados).	45
Tabela 6. Resultados dos testes de assimilação de fontes de carbono (50 isolados).	47
Tabela 7. Perfis de restrição do rDNA 16S obtidos para as estirpes de referência e isolados testados.	52
Tabela 8. Análise de dados relativa aos dendrogramas obtidos com ênfase no número de 'clusters' formados, nível de semelhança dos agrupamentos e isolados agrupados.	62
Tabela 9. Índices de diversidade obtidos para os quatro dendrogramas construídos.	64
Tabela 10. Testes fenotípicos dos isolados identificados por sequenciação e das estirpes de referência a que pertencem.	70
Tabela 11. Perfis de restrição do gene rDNA 16S de estirpes de referência utilizadas no estudo de sequenciação.	71
Tabela A I. Resultados de testes fenotípicos para todos os isolados identificados como <i>P. avastanoi</i> .	87
Tabela A II. Resultados de testes fenotípicos para todas as estirpes de referência.	89
Tabela B I. Resultados de PCR/RFLPs e Nested-PCR para todos os isolados identificados como <i>P. savastanoi</i> .	90
Tabela B II. Resultados de PCR/RFLPs e Nested-PCR para todas as estirpes de referência.	92



I - Introdução

I – Introdução

1. A doença dos nódulos da oliveira

A doença dos nódulos da oliveira tem actualmente um grande impacto nesta cultura, sendo por isso o seu estudo de extrema importância.

Portugal é um dos maiores produtores mundiais de azeite, compreendendo-se, assim, que a cultura da oliveira seja de grande interesse económico para o país. Em todo o país existem cerca de 567 199 olivais produtivos (INGA, 2004). É fundamental manter e melhorar os olivais portugueses, sendo para isso necessário desenvolver métodos que favoreçam a produtividade mesmo em condições de *stress* ambiental, como por exemplo o ataque por organismos patogénicos.

Nas doenças que causam necrose, o primeiro efeito produzido pela presença do patógeno é a morte celular no local da infecção. Os sintomas podem ocorrer nas partes aéreas da planta, incluindo folhas, ramos, flores e frutos. Embora nalguns casos a infecção fique contida, noutros ocorre uma infecção generalizada de toda a planta. Por outro lado, nas doenças que provocam nódulos ou tumores o patógeno induz uma divisão celular descontrolada (hiperplasia), que não resulta na morte celular.

1.1. Características da doença

A doença dos nódulos da oliveira, existe em todas as regiões do mundo onde se pratica o cultivo desta planta. Esta patologia caracteriza-se pela formação de nódulos verdes hiperplásicos mais ou menos esféricos, com diâmetro entre 0,5 e 2,5 mm, desenvolvendo-se maioritariamente em rebentos, ramos e troncos, podendo também as raízes e copas das árvores ser afectadas. Os nódulos jovens têm uma consistência interna mole e esponjosa, contendo bolsas de bactérias em forma de áreas ensopadas e pegajosas. Os nódulos velhos possuem uma superfície rugosa e escura, devido ao desenvolvimento de fissuras profundas, e aparecem em locais onde ocorreram lesões naturais ou outras, tornando-se secos e rijos e desenvolvendo cavidades internas. Os ramos afectados ficam dormentes e em infecções graves podem eventualmente acabar por morrer (Panagopoulos, 1993).

Uma forma invulgar da doença, desconhecida até 1958, origina lesões punctiformes no fruto que aparecem normalmente como manchas semicirculares castanhas, de 0,5 a 2,5 mm de diâmetro tornando-se mais tarde escuras e fundas. As manchas no fruto são na sua maioria superficiais, podem ser rodeadas por halos cloróticos, variam entre 3 a 20 por fruto e podem coalescer, formando áreas lesionadas mais extensas. Este tipo de infecção pode reduzir grandemente o valor comercial dos frutos, particularmente aqueles utilizados em conserva (Panagopoulos, 1993).

1.2. Incidência da doença em Portugal, em particular no Alentejo

A doença dos nódulos constitui o principal problema fitopatogénico dos olivais portugueses, que diminui tanto a produção como a qualidade dos frutos obtidos e dos seus derivados. A importância das perdas causadas por esta doença é difícil de avaliar, dado existirem numerosos factores que influenciam a gravidade dos sintomas, com a agravante dos frutos recolhidos de ramos infectados poderem conter substâncias que confirmam odores ou sabores desagradáveis ao produto final.

Em Portugal, a variedade autóctone de *Olea europaea* L. 'Galega Vulgar' (GV) é conhecida como sendo resistente a esta doença (Figura 1), enquanto que a variedade autóctone 'Cordovil de Serpa' (CS) é muito susceptível (Figura 2).

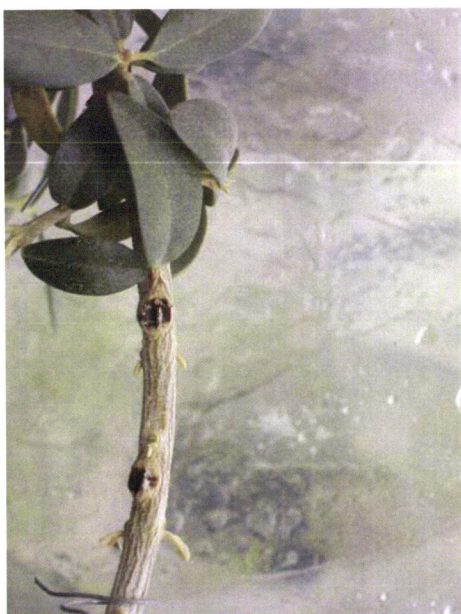


Figura 1: 'Galega Vulgar' onde se observa o aparecimento de necrose com inchaço do caule.

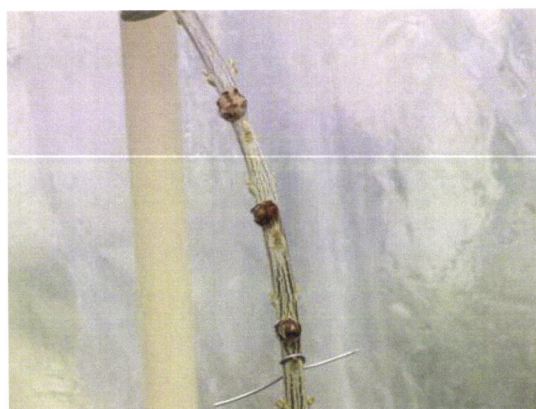


Figura 2: 'Cordovil de Serpa', onde se observa o aparecimento de nódulos no caule, como resposta à infecção.

A primeira variedade distribuiu-se ao longo do país e a segunda é típica da região de Moura – Serpa. Ambas são actualmente propagadas *in vitro* através de embriogénese somática (Leitão *et al.*, 1997) e a sua caracterização molecular foi também desenvolvida usando marcadores de DNA (Gemas *et al.*, 2000; Zilhão, 2005). Existe ainda uma terceira variedade, a ‘Verdeal Alentejana’ (VA), também típica da região alentejana, para a qual não existe ainda nenhum estudo efectuado a nível da resposta ao ataque por *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Cada uma destas variedades confere diferentes características ao azeite a que dá origem.

1.3. Agente patogénico responsável

O agente patogénico da doença dos nódulos da oliveira designa-se por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. As referências a esta doença remontam à época romana e durante muitos séculos foi atribuída a diversos agentes patogénicos, a práticas agrícolas inadequadas ou a distúrbios causados pelo ambiente. Em 1886, Arkangeli detectou a bactéria no interior dos ramos e, alguns anos depois, Savastano (1887/1889) isolou-a de ramos infectados e conseguiu induzir experimentalmente a formação de tumores. Contudo, só em 1904 a doença foi estudada em pormenor e comprovada por Smith e Rorer. Finalmente em 1908, Smith denominou a bactéria responsável pela doença como *Bacterium savastanoi* em memória de Savastano (Panagopoulos, 1993).

1.3.1. O género *Pseudomonas*

Este género de bactérias suscita muito interesse e curiosidade e tem sido objecto de muitos estudos devido à falta de homogeneidade dos microrganismos nele inseridos, quer inter, quer intra-específica. Do ponto de vista taxonómico, o seu desenvolvimento tem sido extensivamente revisto ao longo dos anos e várias tentativas de criar sistemas de classificação de espécies de *Pseudomonas* durante o século passado falharam como sistema determinativo fiável.

A definição deste importante género só começou a tomar consistência após o desenvolvimento e aplicação de técnicas de biologia molecular, que vieram permitir uma análise comparativa a nível genómico.

Algumas das características típicas utilizadas na identificação do género *Pseudomonas* a nível fenotípico e bioquímico são: (i) bastonetes direitos ou ligeiramente curvos com diferentes dimensões; (ii) bactérias Gram-negativas e fluorescentes consoante a espécie (Figura 3); (iii) não formam endósporos; (iv) móveis com flagelos polares; (v) aeróbios, utilizando estritamente o metabolismo respiratório e o oxigénio como aceitador final de electrões, ou o nitrato, em alguns casos; (vi) formação de glucose somente em condições aeróbias e (viii) catalase positivas. O principal critério para que uma bactéria com todas as características referidas seja incluída neste grupo reside no modo de inserção dos flagelos, que é polar. Deste modo o termo *pseudomonas* tem sido usado em sentido demasiado lato para incluir bactérias neste grupo (Bergey's, 2005; Correia, 2000).



Figura 3: A – Morfologia de *Pseudomonas syringae*

(http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/images)

B – Coloração Gram em *Pseudomonas aeruginosa*

(<http://www.mrcophth.com/pathology/selftests/pseudomonas.jpg>)

C – Fluorescência em *Pseudomonas fluorescens*

(http://fvl.vfu.cz/sekce/sek_patob/1240/obrazkova_priloha/mikrob/img)

1.3.1.1. Diversidade

Este género inclui espécies com interesse ecológico, económico e de importância para a saúde pública. Algumas espécies são patogénicas de plantas, enquanto outras são oportunistas em animais e humanos. Outras espécies promovem o crescimento de plantas e exibem funções de supressão de patógenos, podendo ser utilizadas como método biológico de controlo de algumas doenças.

O género *Pseudomonas* engloba um dos grupos de bactérias mais diverso e ecologicamente significativo. Microrganismos pertencentes a este género podem ser encontrados em grande escala em todos os ambientes naturais terrestres e aquáticos

(tanto dulciaquícolas como marinhos), formando associações estreitas com plantas e animais. Esta distribuição natural sugere um grau notável de adaptação fisiológica e adaptação genética (Spiers *et al.*, 2000).

A capacidade de rápida utilização de vários compostos que podem ser substratos ou intermediários de vias metabólicas conhecidas, bem como compostos aromáticos, derivados halogenados e uma variedade de resíduos orgânicos, que dificilmente são degradados por outros grupos de microrganismos, reflecte a diversidade a nível bioquímico do género *Pseudomonas*, tornando alguns membros pertencentes a este género candidatos para utilização em processos de biorremediação (Spiers *et al.*, 2000).

A diversidade dentro deste género não se limita à sua fisiologia, sendo a diversidade fenotípica reflectida a nível genómico, sugerindo que a variabilidade na arquitectura do genoma, tanto do cromossoma como da maquinaria genética acessória, é de particular interesse. Estudos de 'fingerprinting' levados a cabo por vários cientistas revelaram um notável grau de polimorfismos entre estirpes estreitamente correlacionadas fenotipicamente e inseridas na mesma espécie (Spiers *et al.*, 2000).

Esta diversidade advém da interacção entre factores ecológicos e genéticos, sendo a variação crucial no processo de divergência adaptativa. A aquisição de elementos genéticos (plasmídeos, transposões, integrões e fagos) por transferência lateral é um fenómeno importante no processo evolutivo. Provavelmente, a diversificação que se verifica neste género resulta de um longo processo de evolução, ao longo do qual deverão ter ocorrido estes fenómenos de transferência (Spiers *et al.*, 2000).

Muitas espécies inseridas neste género possuem uma capacidade intrínseca de tolerância a vários agentes letais, devido aos genes inseridos num ou mais plasmídeos, em alguns casos megaplasmídeos, considerados como factores de resistência. Estes genes podem codificar para sistemas de resistência a antibióticos, metais pesados, e uma variedade de agentes tóxicos, tanto físicos como químicos. Alguns destes factores de resistência podem ser transferidos para outras bactérias Gram-negativas por conjugação, representando 'pools' de material genético que pode ser partilhado por vários organismos pertencendo a grupos filogenéticos distantes (Spiers *et al.*, 2000).

A nível molecular estas bactérias caracterizam-se por possuírem genomas de elevadas dimensões. Os genomas podem variar desde 3,7 Mb em *P. stutzeri* a 7,1 Mb em *P. aeruginosa*, tendo *P. fluorescens* SBW25, *P. syringae* pv. *phaseolica* e *P. putida*

KT2440, um genoma de 6,7 Mb. Não obstante, estudos de vários isolados da mesma espécie revelaram substanciais polimorfismos de dimensão (Spiers *et al.*, 2000).

Muitas espécies do género *Pseudomonas* possuem um ou mais plasmídeos, em alguns casos megaplasmídeos, que lhes conferem várias propriedades, nomeadamente: resistência a antibióticos, resistência a outros agentes agressores, químicos, físicos e biológicos e determinadas capacidades metabólicas (Correia, 2000). As diferenças genómicas encontradas em várias espécies de *Pseudomonas* podem reflectir a adaptação competitiva destas bactérias a um elevado número de nichos ecológicos, tirando partido dos componentes regulatórios no seu genoma (Spiers *et al.*, 2000). É tentador postular que a selecção pode ter conduzido a mecanismos de evolução através dos quais as pseudomonas aumentaram a sua taxa de mutação sob 'stress', gerando uma variação extra, quando necessária, e facilitando a sua adaptação a novos ambientes. A aquisição de genes e elementos genéticos acessórios, codificando para mecanismos de regulação das vias catabólicas ou associadas a virulência, através da transferência lateral, contribui para o processo de evolução bacteriana. Apesar do indubitável significado deste processo evolutivo dentro deste género e apesar de terem sido descobertas estirpes com elevadas taxas de mutação, não existe nenhuma evidência no sentido de as pseudomonas terem desenvolvido um mecanismo especial para aumentar a sua capacidade de aquisição de DNA exógeno (Spiers *et al.*, 2000).

1.3.1.2. Evolução taxonómica do género *Pseudomonas*

O género *Pseudomonas* tem sido alvo de numerosos estudos ao longo do tempo. Várias espécies inicialmente inseridas neste género, de acordo com as suas características fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas, têm sido posteriormente transferidas para outros géneros.

Estas modificações basearam-se na identificação de cinco grupos de similaridade rRNA formados a partir da hibridação rRNA/DNA que, por utilizar sequências muito conservadas no genoma, veio substituir os estudos de hibridação DNA/DNA. O grupo I, apesar de partilhar várias características fenotípicas com membros de outros grupos, tornando quase impossível a diferenciação baseada em testes tradicionais, continua a ser considerado como o grupo das "verdadeiras pseudomonas", enquanto que aos outros grupos foram associados novos géneros: os grupos II e III incluem os géneros

Acidovorax, *Burkholderia*, *Comamonas* e *Ralstonia*, o grupo IV o género *Brevundimonas* e o grupo V o género *Stenotrophomonas* (Correia, 2000).

Actualmente, a classificação taxonómica do género *Pseudomonas* no “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (2005) baseia-se nas relações filogenéticas das várias espécies pertencentes a este género. A divisão da árvore filogenética obtida com base em sequências de rDNA 16S evidencia dez grandes grupos que, por sua vez, se subdividem em várias espécies (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos filogenéticos do género *Pseudomonas* derivados de sequências rDNA 16S (Adaptado de “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, 2005).

GRUPO FILOGENÉTICO	ESPÉCIE
“ <i>Pseudomonas syringae</i> ”	<i>Pseudomonas amygdali</i>
	<i>Pseudomonas avellanae</i>
	<i>Pseudomonas caricapapayae</i>
	<i>Pseudomonas cichorii</i>
	<i>Pseudomonas ficuserectae</i>
	<i>Pseudomonas meliae</i>
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>
	<i>Pseudomonas syringae</i>
	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>
“ <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ”	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
	<i>Pseudomonas fragi</i>
	<i>Pseudomonas lundensis</i>
	<i>Pseudomonas taetrolens</i>
	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
“ <i>Pseudomonas fluorescens</i> ”	“ <i>Pseudomonas cadrella</i> ”, “ <i>Pseudomonas orientalis</i> ”
	<i>Pseudomonas corrugata</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Pseudomonas marginalis</i> , “ <i>Pseudomonas libaniensis</i> ”
	“ <i>Pseudomonas migulae</i> ”, “ <i>Pseudomonas mandelii</i> ”
	<i>Pseudomonas mucidolens</i>
	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>
	<i>Pseudomonas synxantha</i>
	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
	<i>Pseudomonas veronni</i> , “ <i>Pseudomonas gessardii</i> ”

<i>"Pseudomonas jessenii"</i>	<i>"Pseudomonas jessenii"</i>
<i>Pseudomonas agarici</i>	<i>Pseudomonas agarici</i>
<i>Pseudomonas fuscovaginae, Pseudomonas asplenii</i>	<i>Pseudomonas fuscovaginae, Pseudomonas asplenii</i>
	<i>Pseudomonas fulva</i>
<i>"Pseudomonas putida"</i>	<i>Pseudomonas montelli, "Pseudomonas plecoglossicida"</i>
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Pseudomonas balearica</i>
<i>"Pseudomonas stutzeri"</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>
	<i>Pseudomonas citronellolis</i>
	<i>Pseudomonas flavescens</i>
<i>"Pseudomonas aeruginosa"</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
	<i>Pseudomonas ressinovorans</i>
	<i>Pseudomonas straminea</i>
	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
<i>"Pseudomonas pertucinogena"</i>	<i>"Pseudomonas pertucinogena"</i>

1.3.1.3. A espécie *Pseudomonas savastanoi*

Em 1908, tal como referido anteriormente, Smith, nomeou a bactéria que provoca a formação de nódulos em várias plantas pertencentes à família *Oleaceae* como "*Bacterium savastanoi*" em memória a Savastano, o primeiro cientista a isolar o microrganismo. Esta espécie foi mais tarde transferida para o género *Pseudomonas* por Stevens, como "*Pseudomonas savastanoi*". Em 1978, Young *et al.* propõem uma nova nomenclatura e classificação para a bactéria fitopatogénica, introduzindo o conceito de patovar. Todas as espécies de pseudomonas fluorescentes e oxidases-negativas foram consideradas membros de uma única espécie, *Pseudomonas syringae*, dividindo-se por patovares. Deste modo *P. savastanoi* passou a *P. syringae*

pv. *savastanoi*. Contudo, a designação patovar é uma subdivisão infra-subspecífica não reconhecida pelo Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana, não constando portanto na Lista de Nomes Aprovados de Bactérias.

Em 1981, o “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” considera *P. savastanoi* um patovar de *P. syringae* (*P. syringae* pv. *savastanoi*) com base no estudo de homologia por hibridação rRNA/DNA. Esta classificação foi confirmada em diversos artigos, onde se utilizaram testes fenotípicos e metabólicos, mecanismos de regulação, determinação de sequências de aminoácidos em proteínas seleccionadas, estudos imunológicos e composição da parede celular.

Em 1982, com base em estudos de hibridação DNA/DNA, foi criada uma subespécie de *P. syringae*, passando a designar-se então *P. syringae* subsp. *savastanoi*. Com base no mesmo tipo de estudos, Gardan *et al.* (1992) propõem que se considere *P. savastanoi* como espécie independente, incluindo nesta espécie alguns patovares pertencentes a *P. syringae*: *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (fitopatogénica dos géneros *Oleaceae* e da espécie *Nerium oleander* L.); *P. savastanoi* pv. *glycinea* (fitopatogénica de soja) e *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (fitopatogénica de feijão).

Shaad *et al.* (2000) aceitam a proposta de elevar *P. syringae* pv. *savastanoi* a espécie, rejeitando a passagem de *P. syringae* pv. *glycinea* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* a patovares de *P. savastanoi*, já que segundo os autores estes dois patovares são facilmente diferenciados fenotipicamente de *P. savastanoi*. No entanto, alguns autores continuam a utilizar a classificação proposta por Gardan *et al.* (1992).

Tendo por base as relações filogenéticas evidenciadas por análise das sequências de rDNA 16S (Palleroni, 2005) e as propostas de Gardan (1992) e Shaad (2000), a última edição do Manual de Bergey’s (Palleroni, 2005) reconhece o estatuto de espécie a *P. savastanoi*, englobando os patovares *savastanoi*, *glycinea* e *phaseolicola*.

Neste trabalho será utilizada a nomenclatura mais recente, no que se refere a esta bactéria.

1.3.2. *Pseudomonas savastanoi*

1.3.2.1. Relação com o hospedeiro

Testes de patogenicidade *in vivo*, com diferentes isolados do patógeno, demonstraram que estes são específicos relativamente ao hospedeiro que infectam. No entanto, ainda não se estabeleceu se *P. savastanoi* patogénico em oleandro pode afectar também cultivares susceptíveis de oliveira. Os mecanismos que regulam a especificidade de *P. savastanoi* relativamente ao hospedeiro não estão esclarecidos, apesar de parecerem similares aos de outras pseudomonas parasitas de plantas (Young, 2004).

Os hospedeiros mais relevantes afectados por *P. savastanoi* pv. *savastanoi* são: oliveira (*Olea europaea* L.), oleandro (*Nerium oleander* L.), freixo (*Fraxinus excelsior* L.) e jasmim (*Jasminum* spp.) (Penyalver, 2000).

As estirpes de *P. savastanoi* que provocam nódulos são similares a outros membros da mesma espécie e estreitamente relacionadas com espécies de *P. syringae*. Contudo, diferem de quase todas as outras bactérias fitopatogénicas pela sua capacidade de produzir auxina e citocininas. O efeito destes compostos consiste na indução desregulada de multiplicação celular, levando à formação de nódulos e tumores (Scortichini *et al.*, 2004).

Um outro aspecto importante a ter em consideração, no contexto das interacções planta-patógeno, é se a associação entre *P. savastanoi* pv. *savastanoi* e *O. europaea* representa um exemplo de co-evolução hospedeiro-patógeno, ou um fenómeno de adaptação do microrganismo relativamente à planta (associação por colonização), embora pouco se saiba relativamente a este assunto (Scortichini *et al.*, 2004).

1.3.2.2. Distribuição geográfica

A distribuição geográfica dos patógenos dos nódulos de oliveira estende-se desde a Europa até à Nova Zelândia, havendo registos da doença em muitos países, tal como se sumariza na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição mundial dos patógenos dos nódulos de oliveira,

(Adaptado de Young, 2004).

Europa	Áustria, Chipre, Espanha, França, Grécia, Itália, ex-Jugoslávia, Holanda, Noruega, Portugal, Suécia, Suíça, Reino Unido, Rússia.
Ásia	Geórgia, Irão Iraque, Israel, Líbano, Turquia.
África	África do Sul, Argélia, Líbia, Marrocos, Tanzânia, Tunísia.
América do Norte	México, USA (Arizona, Arkansas, Califórnia, Texas).
América do Sul	Argentina, Brasil, Colômbia, Peru, Uruguai.
Oceânia	Austrália do Sul, Tasmânia, Vitoria, Nova Zelândia.

1.3.2.3. Isolamento, identificação e patogenicidade

O isolamento de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* deve ser feito nos primeiros estádios da infecção, uma vez que nódulos velhos geralmente são invadidos por bactérias secundárias oportunistas, de crescimento mais rápido, tornando a detecção do patógeno mais difícil. A cultura em meio B de King favorece o crescimento desta bactéria, sendo as colónias pequenas e de crescimento lento, após incubação a 27 °C durante 2 a 3 dias.

A produção de pigmentos fluorescentes não é considerada como um teste de diagnóstico fiável. Assim, a identificação do patógeno pode ser feita com base em métodos bioquímicos e moleculares. Pode ser feita ainda uma diferenciação com base na composição de ácidos gordos, no entanto a composição é muito similar em estirpes isoladas de oleandro e oliveira. Neste caso, a diferenciação destas estirpes pode ser alcançada através de métodos moleculares baseados no 'fingerprinting' de restrição de DNA e em outros métodos que se encontram já em desenvolvimento (Young, 2004).

A confirmação de patogenicidade é obtida através de inoculação de suspensões bacterianas nos ramos de plantas susceptíveis em crescimento, mantidas em ambiente controlado durante um mínimo de 42 dias.

1.4. Epidemiologia

As estirpes de *P. savastanoi* estão associadas às oliveiras, não sobrevivendo fora das plantas infectadas e perdendo rapidamente a viabilidade no solo. A proliferação de nódulos ocorre mais intensamente na Primavera, quando as plantas se desenvolvem

mais activamente e o patógeno se encontra na superfície das folhas, apresentando níveis populacionais mais elevados durante a Primavera e o Outono (Young, 2004).

Apesar de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* se comportar em determinadas condições como uma bactéria epifítica, quando se encontra no filoplano, ela é normalmente considerada endofítica não fastidiosa, ou seja, forma uma associação nutricional dentro dos tecidos da planta hospedeira, causando doença.

Com base em estudos epidemiológicos, verifica-se que a entrada do patógeno em plantas susceptíveis é feita através de feridas nas folhas, causadas por geada e granizo no fim da Primavera, cortes provocados por poda ou quando ocorre queda da folha, em condições climáticas de chuva e humidade. O método tradicional de colheita do fruto por varejo pode provocar severas infecções (Young, 2004).

A bactéria sobrevive nos tumores na presença de água, produzindo exsudados que, com a ajuda da chuva, facilitam a sua dispersão e propagação a árvores e plantações contíguas. A gama de temperaturas propícias à infecção situa-se entre os 4 °C e os 38 °C, sendo a temperatura óptima de 23-24 °C.

Os nódulos tendem a alargar após a indução, provocando fissuras por onde a bactéria escapa durante os períodos de chuva, podendo colonizar outras aberturas naturais ou artificiais na árvore, ou ramos e folhas como uma bactéria epifítica. No entanto, a disseminação sistémica da bactéria parece ser pouco frequente ou inexistente e a transmissão do patógeno por semente nunca foi documentada (Scortichini *et al.*, 2004).

Certos estudos indicam que a população das bactérias na superfície pode servir como reservatório de inóculo infeccioso, enquanto que as bactérias que se encontram nos nódulos podem emergir até à superfície dos mesmos, tornando-se disponíveis para colonizar folhas (Ercolani, 1993).

1.5. Métodos de controlo da doença

1.5.1. Métodos tradicionais

Considera-se que a luta contra a doença dos nódulos da oliveira, causada por *P. savastanoi*, deve ser essencialmente preventiva: (i) utilizando variedades pouco sensíveis; (ii) limitando as herdades; (iii) reduzindo potenciais inóculos da bactéria

através da poda dos ramos infectados e desinfecção das feridas causadas e dos instrumentos utilizados (Young, 2004).

A observação de nódulos numa única oliveira coloca em risco todas as outras árvores que estejam próximas, constituindo um foco de transmissão na área que a rodeia. A remoção das árvores afectadas não é por si só um meio eficaz de controlo da doença, sendo necessários meios de controlo que tenham em conta a biologia do patógeno. Sabe-se, por exemplo, que baixos níveis populacionais de *P. savastanoi* podem permanecer nas folhas e nas aberturas naturais das plantas sem induzirem de imediato os sintomas da doença.

Não existe, actualmente, um método eficaz na erradicação eficiente do patógeno quando a sua presença é detectada. Por outro lado, nem sempre se detectam os sintomas da doença e nem sempre os danos são graves. Os nódulos podem ocorrer com diferentes níveis de intensidade, em diferentes localidades, e variar de ano para ano (Young, 2004).

1.5.2. Métodos químicos e biológicos

Embora o controlo químico desta doença seja muito difícil, os tratamentos fitossanitários à base de cobre podem ser utilizados na Primavera e Outono, e ainda quando existir um risco elevado de infecção causado por granizo, geada, ou outros factores que causem feridas nas árvores, numa tentativa de reduzir os sintomas. No entanto, devido à resistência ao cobre por vários patovares de *P. savastanoi*, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de controlo alternativos, tais como métodos biológicos, que diminuem os resíduos pesticidas nos frutos e vegetais, evitam a acumulação de químicos no ambiente e subsequente desenvolvimento de resistência pelos patógenos (Young, 2004).

Várias bactérias fitopatogénicas produzem bacteriocinas que são eficazes contra outras bactérias filogeneticamente relacionadas. Entre as espécies fitopatogénicas de pseudomonas, cerca de dez produzem estes compostos, incluindo-se neste grupo *P. syringae* pv. *syringae* (Lavermicocca *et al.*, 2002).

O estudo realizado por Lavermicocca *et al.* (2002) descreve o potencial da utilização de preparações de bacteriocinas produzidas por *P. syringae* pv. *ciccaronei* no controlo

da expressão dos sintomas da doença dos nódulos da oliveira, reduzindo a sobrevivência epifítica do patógeno no filoplano.

Os resultados obtidos por estes autores, em experiências *in vitro* e *in vivo*, indicam que preparações da bacteriocina podem ser utilizadas no controlo da sobrevivência e multiplicação das populações epifíticas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. A utilização de metabolitos bacterianos em detrimento das bactérias que os produzem é recomendada, de forma a ultrapassar as dificuldades que podem surgir devido à falta de capacidade de colonização e competição de algumas bactérias não patogénicas face às bactérias patogénicas no mesmo nicho ecológico. Para além disso, a elevada especificidade da acção da bacteriocina irá resultar numa alteração selectiva da ecologia dos microrganismos presentes no filoplano. Esta ecologia é de extrema importância no caso das oliveiras, devido à presença de bactérias lácticas benéficas, que desempenham um papel tecnológico importante nos processos de fermentação.

1.6. Mecanismos de resistência à doença

1.6.1. Resistência passiva

As plantas são excelentes fontes naturais de açúcares e aminoácidos, tornando-se extremamente atractivas para uma série de “intrusos”, desde vírus, bactérias e fungos, a insectos. A protecção natural das plantas contra os agentes patogénicos depende de uma variedade de barreiras constitutivas, que actuam mesmo antes de um eventual ataque. O efeito combinado destas barreiras designa-se resistência constitutiva ou inata, e vai desde o espessamento das paredes celulares à produção de compostos antimicrobianos. Embora esta defesa seja eficiente contra um grande número de invasores, alguns patógenos conseguem ultrapassar esta primeira barreira, sendo necessário o desencadeamento de mecanismos activos após o contacto com o agente patogénico, ou seja, mecanismos de resistência induzida ou adquirida (Agrios, 1997).

As bactérias fitopatogénicas evoluíram de forma a crescer e multiplicar-se nos tecidos das plantas, afectando hospedeiros específicos. Desta forma, muitas espécies patogénicas incluem várias “raças fisiológicas”, cada qual diferindo na sua capacidade em infectar diferentes cultivares da planta hospedeira. As bactérias patogénicas de plantas são extracelulares, ou seja, não conseguem crescer dentro das células do hospedeiro. Como não possuem mecanismos activos de penetração nos tecidos, a

sua entrada nos espaços intercelulares do hospedeiro depende de aberturas naturais, feridas e insectos vectores (Young, 2004).

1.6.2. Resistência activa

O mecanismo de defesa designado por Teoria gene-para-gene (Flor, 1971), que requer a interacção/reconhecimento de uma proteína codificada por um gene de avirulência (*Avr*) do patógeno com uma proteína codificada por um gene de resistência específico (*R*) na planta, encontra-se bem descrito (Luderer & Joosten, 2001). Como resultado desta interacção desencadeia-se uma resposta hipersensitiva (HR), na qual ocorre a morte celular localizada no ponto de infecção, limitando o progresso da doença. Esta resposta local pode ainda desencadear um mecanismo de resistência sistémica adquirida (SAR – “Systemic Aquired Resistance”) que conduz à resistência contra diversos organismos patogénicos durante algum tempo (De Wit, 2002).

Existem dois tipos possíveis de interacção hospedeiro-patógeno (Figura 4). O reconhecimento de um gene *Avr* pelo respectivo gene *R* desencadeia uma resposta HR e a interacção é incompatível, traduzindo-se numa resposta fenotípica característica. Caso não exista um dos genes, *Avr* ou *R*, a interacção é compatível. Neste caso se existir o gene *Avr* e não existir o gene *R*, o gene *Avr* pode actuar como um gene de virulência (*vir*) (De Wit, 2002).

Vários genes *R* foram clonados a partir de diversas espécies. Apesar destes genes conferirem resistência contra diversos patógenos, os seus produtos partilham semelhanças estruturais, sugerindo que existem determinados sinais e eventos em comum na resposta defensiva da planta. É predizível que muitos destes genes codifiquem para proteínas citoplasmáticas.

O primeiro gene bacteriano de avirulência a ser clonado foi o gene *avrA* da raça 6 de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, por Staskawicz *et al* (1984). Após hibridação deste gene com DNA de outras raças desta espécie não se detectaram sinais positivos, concluindo-se que este gene pura e simplesmente não existia nestas raças e levantando a hipótese de ter havido deleções prévias, ou do gene *avrA* presente na raça 6 ter sido introduzido através de uma fonte exterior. Esta última hipótese foi confirmada por ‘Southern blot’, onde foram detectadas cópias de DNA exógeno (Keen, 1990).

Subsequentemente, outros genes de avirulência foram clonados e caracterizados. No entanto, tanto as funções que desempenham no patógeno, como o mecanismo pelo qual conseguem elicitar uma resposta hipersensitiva na planta, são geralmente desconhecidas.

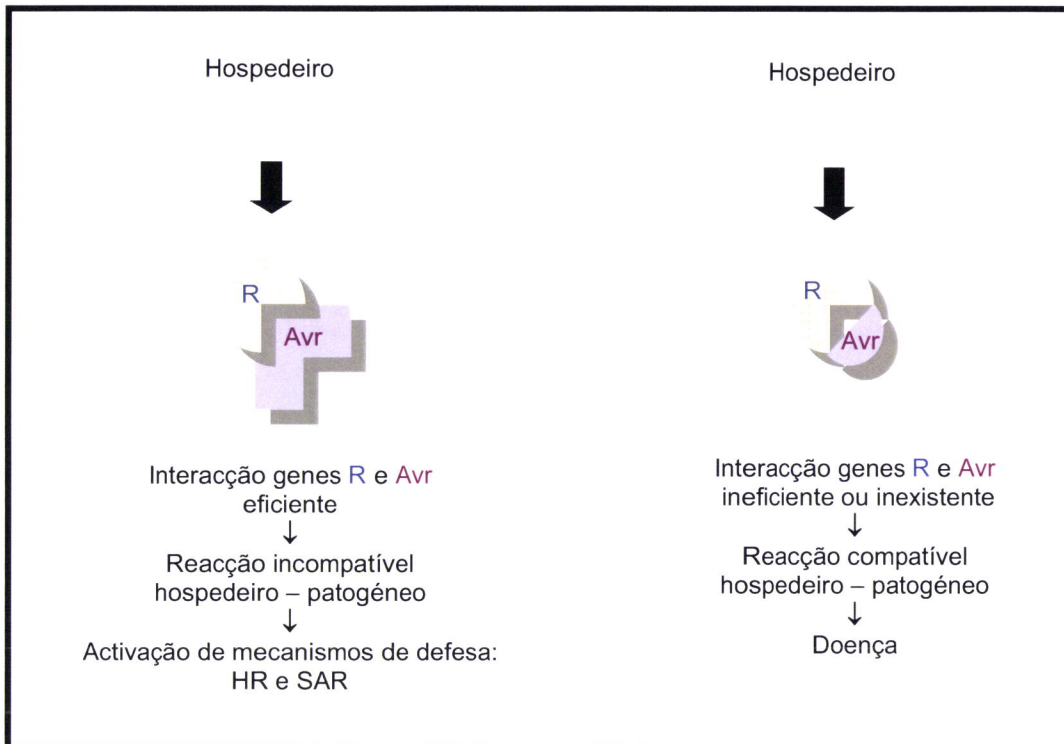


Figura 4: Mecanismos de resistência e susceptibilidade em plantas.

O número de interações hospedeiro-patógeno, para as quais tenha sido provado uma interação física directa entre as proteínas R e Avr, é ainda muito limitado. Esta observação sugere que em várias destas interações não existe uma ligação física directa entre estas proteínas, e que a percepção da proteína Avr pela correspondente proteína R é estabelecida de uma forma indirecta. Esta percepção indirecta implica a intervenção de um terceiro componente (Luderer and Joosten, 2001).

A 'Hipótese Guarda' propõe que este terceiro componente pode ser o alvo de virulência de uma proteína Avr. Deste modo, a ligação da proteína Avr ao seu alvo é detectada pela sua proteína R correspondente, a qual está a 'guardar' o alvo de virulência. Um aspecto intrigante desta hipótese é que o produto do gene *Avr* causa avirulência por parte do patógeno, durante a interacção com o seu alvo de virulência no hospedeiro. Isto pode significar que as proteínas Avr têm um papel bifuncional

(tanto de avirulência, como de virulência), podendo esta dualidade estar baseada num único evento bioquímico (Luderer & Joosten, 2001).

P. savastanoi pv. *savastanoi* é capaz de induzir uma variedade de sintomas em plantas, estando a espécie dividida em variantes patogénicas designadas por patovares, que estão relacionados com o hospedeiro que infectam. Existem duas reacções distintas possíveis quando a bactéria se infiltra nos tecidos da planta. A primeira é uma interacção compatível num hospedeiro susceptível, que se caracteriza pelo sintoma designado por 'water soaking', a que se segue a proliferação do patogéneo e desenvolvimento dos sintomas. Em contraste, hospedeiros resistentes desencadeiam uma reacção de hipersensibilidade, surgindo necroses ao fim de 12 a 24h após infecção (Bender *et al*, 1999).

1.6.2.1. Compostos que afectam a capacidade de virulência

Um 'cluster' de genes conservado em procariotas fitopatogénicos, designado por região *hrp* (resposta hipersensitiva e patogenicidade), afecta a capacidade da bactéria em induzir a resposta hipersensitiva em não-hospedeiros, a sua patogenicidade em plantas hospedeiras e a capacidade de se desenvolver dentro ou na superfície da planta. Sabe-se ainda que estes genes codificam para a regulação e biosíntese da via de secreção Tipo III, utilizada para segregar proteínas de virulência, que é semelhante em patogéneos de animais e plantas. Para além dos genes *hrp*, as pseudomonas expressam genes cujos produtos aumentam significativamente a sua capacidade de virulência, nomeadamente polissacáridos extracelulares, fitotoxinas, enzimas de degradação da parede celular, fitohormonas e citocininas (Bender *et al*, 1999).

Relativamente à importância dos genes *hrp*, Sisto *et al*. (2004) demonstraram que a inactivação deste 'cluster' de genes impede completamente tanto a formação de nódulos pelo patogéneo *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, como a sua multiplicação dentro do tecido do hospedeiro, ou seja, que os sintomas causados no hospedeiro não dependem exclusivamente da produção de fitohormonas e citocininas.

1.6.2.2. Fitotoxinas

As fitotoxinas são produzidas por patógenos ou podem resultar como produtos da interacção hospedeiro-patógeno, prejudicando directamente os tecidos do hospedeiro e influenciando o desenvolvimento da doença ou dos sintomas. Tanto bactérias como fungos patogénicos produzem diversos metabolitos secundários tóxicos para as plantas. As fitotoxinas podem ser específicas para um hospedeiro e serem exclusivas de um determinado patógeno, ou serem não-específicas e apresentarem actividade numa vasta gama de hospedeiros (Bender *et al*, 1999).

A maioria das toxinas produzidas por *P. syringae* geralmente induz clorose (coronatina, faseolotoxina e tabotoxina) ou necrose (siringomicina e siringopeptina). Apesar das fitotoxinas não serem necessárias para a virulência de *P. syringae*, geralmente funcionam como factores de virulência nesta bactéria fitopatogénica. A sua produção resulta num aumento da severidade da doença. Por exemplo, as fitotoxinas podem contribuir para: (i) o movimento sistémico da bactéria na planta; (ii) influenciar o tamanho da lesão e (iii) a multiplicação do patógeno no hospedeiro (Bender *et al*, 1999).

1.6.2.3. Fitohormonas

Uma grande variedade de microrganismos associados a plantas tem a capacidade de, uma vez no interior do hospedeiro, alterar os níveis hormonais endógenos da planta, podendo metabolizar precursores de síntese hormonal ou produzir e segregar fitohormonas semelhantes. Uma vez que os sinais hormonais são críticos para a regulação de vários processos fisiológicos, quaisquer modificações nos seus níveis hormonais através da interacção com estes microrganismos pode levar a alterações, favoráveis ou desfavoráveis, no crescimento e desenvolvimento da planta, dependendo do microrganismo em questão (Patten *et al.*, 2000).

A auxina ácido indoleacético (IAA), produzida naturalmente pelas plantas, é crítica para o seu crescimento e desenvolvimento. Está envolvida no controlo do processo de dominância apical, alongação e diferenciação do xilema. A regeneração de plantas *in vitro*, por exemplo, é dependente da razão auxina:citocinina no meio de crescimento. Existem formas modificadas de IAA em plantas, onde se crê conferirem propriedades de transporte, armazenamento e destoxificação. Conjugados glicosilados são frequentemente encontrados em tecidos germinais, podendo ser utilizados durante a

germinação e nos primeiros estágios de desenvolvimento. Conjugados de IAA com aspartato e glutamato foram isolados de tecidos vegetais, parecendo representar formas inativas da hormona (Roberto, 1990).

A produção de IAA pode aumentar a competitividade de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Os benefícios conferidos a bactérias co-inoculadas com estirpes produtoras de IAA podem envolver modificações bioquímicas nos tecidos da planta hospedeira. A turgescência e o aumento de permeabilidade nas células de vários tipos de tecidos vegetais estão relacionados com a produção de IAA. As bactérias que se encontram no local da infecção são beneficiadas pelo aumento de disponibilidade de nutrientes. Outro benefício para as bactérias oportunistas pode ser o metabolismo e destoxificação de análogos do triptofano, inibidores tanto da planta hospedeira como dos microrganismos que se encontrem na vizinhança (Silverstone *et al.*, 1993).

Estima-se que 80% das bactérias isoladas da rizosfera podem produzir IAA. Algumas, tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas syringae* são fitopatogénicas, enquanto outras, incluindo membros dos géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Enterobacter*, estimulam o crescimento da planta (Patten & Glick, 2000).

Existem várias vias biosintéticas envolvidas na produção de IAA em bactérias, classificadas em termos dos intermediários. A via da indoleacetamida, na qual a enzima triptofano monooxigenase converte o triptofano em indoleacetamida e a enzima indoleacetamida hidrolase cataliza a conversão de indoleacetamida a ácido indoleacético, é a principal via de produção de IAA em estirpes de *P. syringae*, *A. tumefaciens* e *E. herbicola*. Por outro lado, a síntese de IAA em *Enterobacter cloacae* e espécies de *Azospirillum* utiliza o ácido indolepirúvico como intermediário. Esta via envolve a transaminação do triptofano em ácido indole-3-pirúvico, seguida de uma descarboxilação do 3-acetaldeído pela indole-3-piruvato descarboxilase e uma oxidação final, dando origem ao IAA (Patten & Glick, 2000).

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* consegue conjugar o ácido indoleacético com o aminoácido lisina, utilizando a via da indoleacetamida e dando origem à formação de 3-indoacetyl- ϵ -lisina (IAA-lisina) (Figura 5). A enzima responsável pela conversão de IAA a IAA-lisina é a (indol-3-acetil) -L-lisina sintetase. Esta enzima depende de ATP e cataliza a formação de uma ligação entre o grupo carboxil do IAA e o grupo amina do aminoácido lisina (Penyalver *et al.*, 2000; Glass & Kosuge, 1986).

Em bactérias que não utilizam a enzima indoleacetamida na produção de IAA, de um modo geral, verificou-se que suplementos de triptofano aumentam drasticamente a produção deste composto. Em contraste, os genes envolvidos na via de produção de IAA em *P. syringae* pv. *syringae* e *P. savastanoi* pv. *savastanoi* são transcritos de uma forma constitutiva (Patten & Glick, 2000).

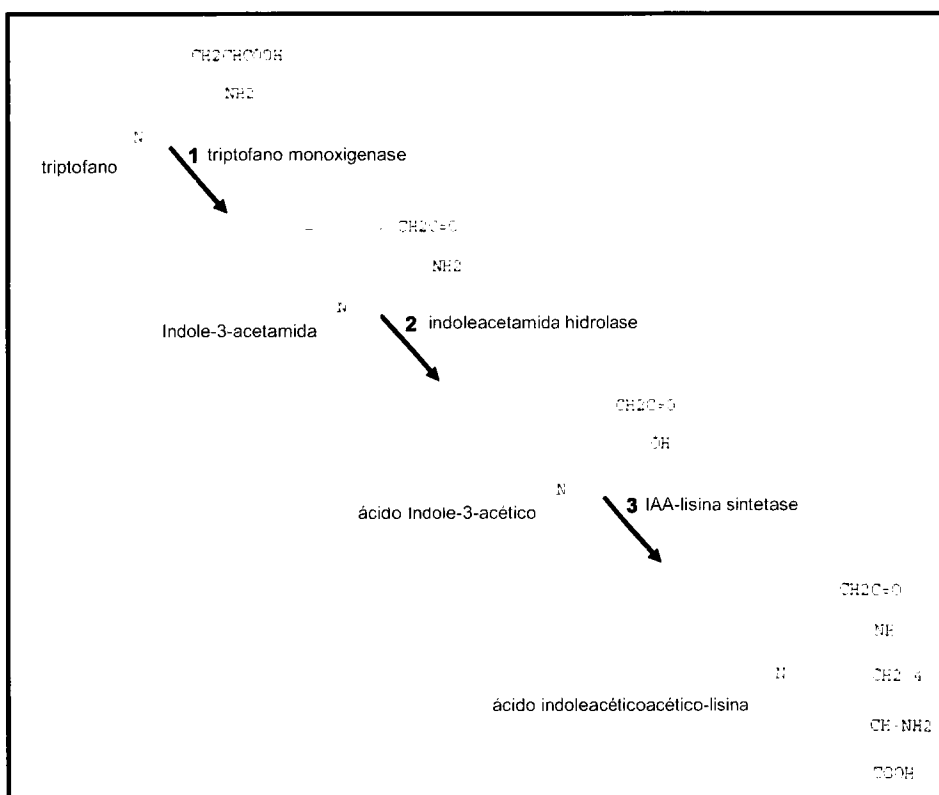


Figura 5: Via de produção de ácido indoleacético em *P. savastanoi*.

Os genes *iaaM*, *iaaH* e *iaaL* que codificam para a produção das enzimas triptofano monooxigenase, indoleacetamida hidrolase e IAA-lisina sintetase respectivamente, localizam-se no plasmídeo pIAA1 em estirpes isoladas a partir de nódulos de oleandro, enquanto que em isolados de oliveira a sua localização é cromossomal. Em estirpes isoladas de oleandro os genes *iaaM* e *iaaH* encontram-se organizados num operão, distando 2-3 kb do gene *iaaL*, sendo este transcrito na direcção oposta. Não se sabe se as funções relacionadas com o metabolismo de IAA se localizam na região entre o operão IAA e o gene *iaaL*. O tamanho e a composição do plasmídeo podem variar entre estirpes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Penyalver *et al.*, 2000; Glass & Kosuge, 1993; 1988; 1986; 1985 e 1980).

A produção de ácido indoleacético por *P. savastanoi* está directamente associada com a capacidade de virulência desta bactéria e tem sido objecto de estudo de diferentes grupos de trabalho. A via de síntese deste composto apresenta várias funções, incluindo a destoxificação de vários análogos do triptofano, capazes de inibir o seu crescimento. Algumas estirpes super-produtoras podem vir a ser utilizadas como estirpes de referência em estudos futuros (Almonacid *et al.*, 2000).

Comai & Kusage (1988) mostraram que a inserção de um elemento de DNA móvel no gene *iaaM* em alguns mutantes IAA inactiva a sua expressão, suprimindo a capacidade de virulência, e que este elemento de DNA móvel com elevado número de cópias se encontra tanto no cromossoma como em plasmídeos. Posteriormente, através da clonagem do gene *iaaL* ficou determinado que a produção de IAA ajuda a conferir a indução de tumores em oliveira e oleandro. A perda de capacidade de produção deste composto provoca apenas turgescência nos pontos de inoculação em oleandro. Quando o gene *iaaL* foi introduzido num isolado de oliveira, observou-se acumulação de IAA-lisina enquanto que o IAA teve uma redução de 30%. Assim, a conversão de IAA em IAA-lisina influencia a quantidade de IAA em *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, que continua a ser capaz de se multiplicar no tecido hospedeiro 16 dias após inoculação. Não sendo necessário para a multiplicação do patógeno é certamente crucial para a expressão dos sintomas da doença (Comai & Kusage, 1986).

A quantidade de IAA em cultura está correlacionada com a capacidade de virulência, uma vez que elevados níveis do composto levam a um aumento de dimensão dos nódulos. O 'pool' de IAA é regulado pela razão de síntese de IAA e pela razão de conversão de IAA em compostos adicionais tais como IAA-L. Espera-se assim que o desenvolvimento de nódulos seja afectado pela alteração destas razões. Presume-se que o IAA seja libertado no tecido da planta hospedeira pela hidrólise de IAA-lisina e que o IAA livre seja a forma activa do composto que promove a formação de tumores. Contudo, o IAA livre torna-se susceptível a ser degradado pelas peroxidases e IAA oxidases da planta, enquanto que os conjugados deste composto são resistentes à degradação. A capacidade de converter IAA em IAA-lisina pode ser necessária para que haja uma óptima taxa de crescimento e expressão dos factores de virulência em isolados de oleandro no hospedeiro (Comai & Kusage, 1986).

Foi demonstrado que a formação de nódulos por *P. savastanoi* pv. *savastanoi* em oliveira e oleandro depende da produção de IAA e citocininas em conjunto. Uma diminuição do período de incubação e aumento do crescimento dos nódulos está

correlacionado com um aumento de produção de IAA e citocininas e estirpes mais virulentas, ou seja, capazes de induzir a formação de nódulos de maiores dimensões no menor período de incubação, apresentam maiores níveis de IAA e citocininas em cultura. Actividades elevadas de citocininas parecem estar associadas à patogenicidade em vários organismos tais como bactérias, fungos e insectos, causando um sobre-crescimento em plantas, e as infecções em oliveira e oleandro por *Pseudomonas savastanoi* podem ser mais um exemplo no qual as citocininas desempenham um papel importante no desenvolvimento de sintomas (Surico *et al.*, 1985).

Os genes que codificam para a produção de citocininas por *P. syringae* pv. *savastanoi*, tanto em estirpes isoladas de oliveira como de oleandro, localizam-se num plasmídeo diferente do que possui os genes que codificam para a produção de IAA. A produção de citocininas varia de acordo com a produção de IAA, no entanto, só é iniciada após se ter atingido o pico de produção deste composto. Enquanto que o aparecimento dos nódulos se deve provavelmente à produção de IAA nos tecidos infectados e parece fazer diminuir o tempo de incubação da doença, a produção de citocininas parece afectar o aumento de dimensão dos nódulos (Gardan *et al.*, 1992b).

2. Diversidade fenotípica e genómica em *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

A classificação tradicional de bactérias baseava-se inicialmente na variação de um determinado número de características fenotípicas e bioquímicas, tais como observação microscópica, crescimento em meios específicos e reacções enzimáticas. Estes testes podem ser morosos e conduzir a resultados ambíguos ou mesmo errados. Por outro lado, são muitas vezes desapropriados quando se estuda uma população de bactérias estreitamente relacionadas. Embora indispensável e em alguns casos adequada, a abordagem baseada exclusivamente nestes métodos tem-se revelado insuficiente.

Assim, a utilização de métodos fenotípicos padronizados que permitem a identificação e caracterização de microrganismos veio revolucionar a classificação de bactérias e tornou-se indispensável, sendo os sistemas comerciais tais como galerias API e BIOLOG, os mais utilizados.

Posteriormente surgiram os métodos moleculares, hoje em dia essenciais para a organização taxonómica das bactérias. A análise molecular envolve a utilização de

técnicas que permitem diferenciar microrganismos a vários níveis. Alguns métodos revelam um elevado poder discriminante relativamente a membros filogeneticamente próximos, e também permitem a detecção de novas espécies com um nível de sensibilidade muito superior à revelada pelos métodos tradicionais. A biologia molecular é utilizada actualmente como uma ferramenta poderosa na identificação, classificação e caracterização a nível inter e intra-específico de muitos organismos.

A tipificação molecular de patogéneos pode ser utilizada para estudos de variabilidade genética. Esta análise detalhada, a nível de espécie, permite avaliar a diversidade de uma determinada população e acompanhar a sua plasticidade genómica e evolução. Pode assim avaliar-se a adaptação dos microrganismos a várias mudanças nas condições ambientais. A aplicação de técnicas moleculares nesta avaliação deve garantir um elevado poder de diferenciação e reprodutibilidade nos resultados obtidos.

A comparação e alinhamento de sequências dos ácidos nucleicos ribossomais (rRNA), ou das sequências de genes correspondentes (rDNA) e/ou o alinhamento de sequências nucleotídicas de outros genes, permite a reconstrução filogenética e a informação taxonómica obtida é inestimável.

Estudos epidemiológicos levados a cabo por Iacobellis *et al.* (1993) na Itália Central mostraram que o isolamento efectuado a partir de nódulos de oliveira, bem como do filoplano, deu origem a culturas puras de bactérias levano-positivas e não fluorescentes, contrariamente às estirpes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* isoladas de oliveira. O frequente isolamento de bactérias com estas características levou à sua caracterização com base em testes de patogenicidade, testes bioquímicos, produção de fitohormonas e isolamento de plasmídeos. Apesar das estirpes diferirem das estirpes típicas, pertencem à mesma espécie e todas elas produzem de um modo constitutivo elevados níveis de auxinas e citocininas, reconhecidos como factores de virulência desta espécie.

Foi demonstrado por Ercolani (1993) que a maioria das estirpes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* recolhidas de folhas escolhidas aleatoriamente em Abril e Outubro, revelam baixos valores de similaridade fenotípica entre si quando comparadas com a maioria das estirpes extraídas de nódulos nas mesmas alturas do ano. Deste modo, a maioria das estirpes recuperadas dos nódulos parece reflectir o fenotipo das estirpes que, na altura da infecção, dominavam as comunidades bacterianas epifíticas.

Todas as estirpes isoladas de nódulos de vários hospedeiros foram durante muito tempo agrupadas em *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, embora fosse controversa a

existência de variações importantes a nível patológico, bioquímico e genético, bem como incompatibilidades na inoculação cruzada entre plantas diferentes. Por estes motivos vários autores propuseram uma nova classificação da bactéria (Ercolani, 1993).

Descobertas posteriores à proposta de Jansen (1982) confirmaram que estirpes isoladas a partir de oliveira e de oleandro se encontram separadas em dois grupos homogêneos com base no seu perfil de ácidos gordos e na localização dos genes envolvidos na produção de IAA (cromossómico ou extracromossómico) e em diferenças de 'fingerprint' de restrição de DNA. Contudo, outros autores como Ercolani e tal, 1993 acreditam na potencial influência de uma vasta gama de condições ambientais que podem ter impacto nos requisitos nutricionais e fisiológicos desta bactéria.

Young & Triggs em 1994 avaliaram o potencial determinante de 36 testes bioquímicos em 395 estirpes representantes de vários patovares de *P. syringae* e de três patovares de *P. savastanoi*. A análise dos resultados demonstrou que a maioria das estirpes (82%) se distribuem por 15 grupos distintos, que podem reflectir os grupos como patovares ou como um *taxon* superior, uma vez que não se conseguem separar os patovares das duas espécies em estudo e algumas estirpes dos patovares de *P. syringae* não conseguem formar grupos distintos.

Alvarez *et al.* realizaram um estudo em 1998, com o intuito de obter informação adicional relativamente às populações da bactéria fitopatogénica *P. savastanoi* pv. *savastanoi* recolhida de diferentes hospedeiros em diferentes regiões de Espanha. Os autores procuravam definir se as variações fenotípicas se devem a factores abióticos, ou a outros factores, e se estas estirpes diferem suficientemente para poderem ser consideradas patovares. Os resultados agruparam os isolados em 15 fenótipos, ficando estabelecida uma possível influência dos factores ambientais, uma vez que estirpes isoladas de nódulos de uma espécie de planta com diferentes origens geográficas são segregadas. A análise destes resultados leva a crer que existem grupos homogêneos baseados em aspectos patológicos e bioquímicos, tendo em conta que estirpes de diferentes hospedeiros mas do mesmo local aparecem também segregados. Em suma, a variação existente pode ser o resultado da interacção de dois tipos de factores em simultâneo, condições ambientais e especificidade do hospedeiro. Estes resultados confirmam que as populações de diferentes patossistemas são diferentes e podem distinguir-se umas das outras através de caracteres fenéticos fiáveis como: (i) perfis de ácidos gordos; (ii) produção de bacteriocinas e (iii) diferenças

de 'fingerprint' de restrição de DNA. Existe uma heterogeneidade evidente a nível bioquímico nas estirpes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, podendo esta dever-se a factores ambientais, disponibilidade de recursos na planta hospedeira ou porque de facto representam patovares diferentes.

A detecção e identificação de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* por métodos moleculares expeditos encontra-se descrita. Inicialmente, esta detecção começou por ser realizada através de crescimento enriquecido de bactérias isoladas de variedades inoculadas ou infectadas naturalmente e ainda de tecidos assintomáticos, tirando partido da técnica de PCR e utilizando 'primers' específicos dirigidos para o gene *iaaL*, não homólogo com outros genes existentes nas bases de dados (Penyalver *et al.*, 2000).

Foram desenhados 'primers' internos e aplicada uma técnica ainda mais sensível de detecção de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* em oliveiras assintomáticas, baseada no método Nested-PCR numa única reacção (Bertolini *et al.*, 2002a). Posteriormente, esta técnica foi adaptada a um ensaio de Multiplex-nested RT-PCR que permitiu a detecção simultânea de *P. savastanoi* e de quatro vírus diferentes em isolamentos provenientes de quinze cultivares (Bertolini *et al.*, 2002b).

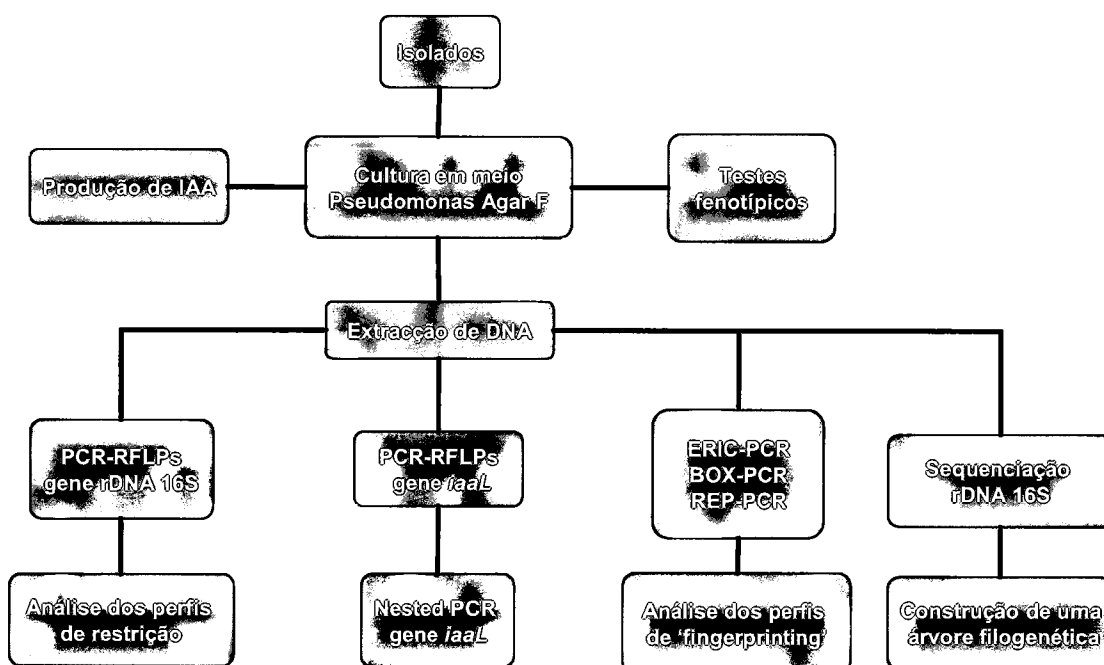
O estudo da diversidade genómica em populações de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* utilizando os 'primers' ERIC, BOX e REP na amplificação de sequências repetidas ao longo do genoma foi efectuado em 360 estirpes obtidas a partir de 11 árvores de *Olea europaea* provenientes de diferentes províncias italianas. A estrutura populacional das estirpes foi determinada através de três algoritmos hierárquicos, mostrando uma elevada semelhança entre os isolados. Verificou-se que os 'primers' REP revelaram o maior poder discriminante e que vários 'fingerprints' a partir do mesmo cultivar persistiram ao longo de 2 anos de amostragem. A análise conjunta dos 'fingerprints' obtidos com os três 'primers' utilizando o método de aglomeração UPGMA revelou 20 perfis a um nível de 81% de semelhança, sem agrupamento dos isolados. Contrariamente, dados obtidos a partir da literatura demonstram um claro agrupamento dos cultivares. Parece portanto que o hospedeiro e o patógeno não co-especiaram. A estreita adaptação da bactéria à oliveira deve representar um fenómeno de associação por colonização (Scortichini *et al.*, 2004).

3. Objectivos e plano estrutural do trabalho realizado

Neste estudo utilizou-se uma abordagem polifásica na caracterização dos isolados obtidos a partir da recolha de nódulos de oliveira, do seguinte modo:

- Caracterização fenotípica dos isolados através de coloração de Gram, detecção de actividade das enzimas catalase, oxidase e L-aminopeptidase, e testes bioquímicos.
- Pesquisa da produção *in vitro* de ácido indolacético (IAA) pelos isolados utilizando uma técnica colorimétrica.
- Identificação dos isolados ao nível de género por PCR-RFLPs do rDNA 16S.
- Identificação dos isolados ao nível de espécie por PCR-RFLPs do gene *iaaL*.
- Identificação e confirmação dos isolados por Nested-PCR do gene *iaaL*.
- Avaliação da diversidade genómica dos isolados de *P. savastanoi* por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR.
- Sequenciação da região rDNA 16S de alguns isolados identificados como *P. savastanoi* e construção de uma árvore filogenética.

Esquema representativo do plano estrutural do trabalho realizado:





II – Material e Métodos

II - Material e Métodos

Nos estudos fenotípicos e moleculares realizados, incluíram-se nove estirpes tipo e seis estirpes de referência referidas na Tabela 3.

Tabela 3. Estirpes tipo e de referência utilizadas nos testes fenotípicos e moleculares.

Estirpe	Origem
<i>Pseudomonas savastanoi</i> ¹	CECT 93
<i>Pseudomonas savastanoi</i> ²	DSMZ 50298 ^T
<i>Pseudomonas savastanoi</i> ³	NCPB 2327
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CFBP 2556 ^T
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	NCPB 2411 ^T
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CFPB 2212 ^T
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	CFBP 2351 ^T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 110 ^T
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT 378 ^T
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 324 ^T
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CECT 930 ^T
<i>Pseudomonas</i> sp.	FCUL
<i>Pantoea agglomerans</i>	U. Évora
<i>Erwinia toletana</i>	U. Évora
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 861

¹ Isolada de oleandro; ^{2, 3} Isoladas de oliveira.

1. Isolamento de *P. savastanoi* através da recolha e processamento de nódulos de árvores sintomáticas

A recolha de nódulos das variedades de *Olea europaea* L. Galega Vulgar (GV), Cordovil de Serpa (CS) e Verdeal Alentejana (VA) foi efectuada no Alentejo, em várias herdades, nas regiões de Moura, Reguengos e Serpa (Tabela 4).

Tabela 4. Relação entre a origem de recolha das amostras e o número de colónias isoladas.

Região	Herdade	Nº total de árvores	Nº CS	Nº GV	Nº VA	Nº Colónias isoladas
Moura	Sampaio Novo (SN)	5	4	1	-	10
	Pinta Barris (PB)	8	7	1	-	30
Reguengos	Falcoeira (HF)	2	-	2	-	3
	Estrada (HE)	3	-	3	-	5
	Monte Gato (MG)	2	-	2	-	4
Serpa	São Domingos (SD)	11	5	4	2	35
	Brinches (B)	15	5	5	5	40
	Total	62	26	24	12	169

O isolamento de bactérias totais a partir dos nódulos de oliveira foi efectuado através de uma adaptação do método de Alvarez *et al.* (1998) e o número de colónias isoladas relativamente à origem de recolha encontra-se referida na Tabela 4.

Para cada árvore seleccionaram-se vários nódulos de diferentes dimensões, que foram lavados com etanol a 70% e secos em papel absorvente. A seguir procedeu-se a uma lavagem com 150 ml de H₂O destilada estéril, com agitação, durante 30 min a 28°C. Os nódulos foram cortados em porções com menor dimensão possível em condições de assépsia e transferidos para um tubo com 5 ml de H₂O destilada. As suspensões bacterianas foram obtidas após agitação vigorosa durante 5 min. A partir das suspensões, fizeram-se diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ e inoculou-se 100 µl de cada uma das diluições em meio sólido Pseudomonas Agar P (Merk). A incubação foi efectuada numa estufa a 28°C.

Após crescimento, seleccionaram-se todas as colónias representantes dos diferentes tipos de morfologia obtidas a partir da diluição 10⁻³. As colónias seleccionadas foram purificadas recorrendo a repicagens sucessivas por riscado a partir de uma colónia isolada, no mesmo meio de cultura, e mantendo as condições de incubação.

2. Caracterização fenotípica

Todas as colónias isoladas foram submetidas a um conjunto de testes fenotípicos que permitem a identificação a nível do género *Pseudomonas*.

Para determinação do tipo de reacção de Gram, observação da morfologia e para detecção das actividades da catalase e oxidase, recorreu-se a métodos correntemente utilizados em Bacteriologia e que se encontram descritos em diversos manuais de laboratório (ver como exemplo Gerhardt *et al.*, 1981).

O procedimento experimental de detecção da enzima L-alanina aminopeptidase foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Bactident Aminopeptidase, Merck).

Para a pesquisa de produção de pigmentos fluorescentes foram utilizados os meios de cultura comerciais *Pseudomonas* Agar F (Merck) e *Pseudomonas* Agar P (Merck). A inoculação e observação das placas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3. Caracterização bioquímica

Para caracterização bioquímica foi seleccionado aleatoriamente um conjunto de isolados. Utilizaram-se as galerias API 20 NE (bioMérieux) e testes bioquímicos incluídos nas galerias API 50 CH (bioMérieux), frequentemente utilizadas no estudo de *Pseudomonas* isoladas de diferentes hospedeiros. Estes últimos testes foram preparados no laboratório, tal como descrito seguidamente.

O sistema Api 20 NE é um micro-método que permite a identificação de bastonetes Gram-negativos, não fastidiosos e que não pertençam à família *Enterobacteriaceae*. A inoculação das estirpes escolhidas bem como os resultados da leitura da galeria foram efectuadas de acordo com as instruções do fabricante (bioMérieux).

Para os testes incluídos nas galerias API 50 CH utilizaram-se caixas com 24 poços ('NUNC' TC24), em substituição das galerias API 50 CH. Preparou-se meio base (0,3 g / L de extracto de levedura, 1 g / L de $(\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4$, 0,2 g / L de KCl, 0,2 g / L de MgSO_4 e 7 g / L de agar), com o indicador de pH púrpura de bromocresol 0,04%. A partir do meio base foram preparados diferentes meios suplementados com fontes de carbono a 0,5% (adonitol, arabinose, celobiose, citrato, eritrose, frutose, fucose,

galactose, glucose, glicerol, inositol, manitol, manose, melobiose, rafinose, ramnose, ribose, sacarose, sorbose, sorbitol, trealose, turanose e xilanose). Distribuiu-se 1 ml de cada meio suplementado por cada um dos poços da caixa 'NUNC' TC24. Preparou-se uma suspensão de bactérias em soro fisiológico correspondendo aproximadamente ao valor 2 da escala de MacFarland (bioMérieux), e inoculou-se 10 µl da suspensão de células em cada um dos poços. Procedeu-se à leitura dos resultados após 24 horas de incubação a 28°C, por registo de alteração de cor apresentada pelo indicador de pH dos meios e por comparação com os mesmos meios de cultura não inoculados.

Todos os isolados identificados como pertencendo ao género *Pseudomonas* e potenciais membros da espécie *P. savastanoi* foram conservados em meio BHI contendo 20% de glicerol a – 70°C.

4. Produção de Ácido Indolacético (IAA)

A pesquisa da produção de IAA *in vitro* foi efectuada a partir de um grupo de isolados seleccionados aleatoriamente, utilizando uma adaptação do método descrito por Almonacid *et al.*, (2000). Para tal repicou-se uma colónia de cultura para um tubo contendo meio líquido BHI (Biokar Diagnostics) suplementado com 0,2% de L-triptofano. A incubação foi feita a 28°C com agitação, durante 24 horas. As células foram centrifugadas a 4000 g durante 10 min e o sobrenadante recolhido para um tubo de ensaio de vidro com tampa. Misturou-se 1 ml de sobrenadante com 2 ml de reagente Van Urk Salkowski (FeCl₃ 0,5 M e 35% de HClO₄ em H₂O). Após 25 min, a leitura da densidade óptica foi efectuada por espectrofotometria (Unicam 8700 UV/vis Philips) a 530 nm e a concentração de IAA produzido estimada a partir de uma curva padrão de IAA onde se incluíram os pontos 10 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml e 300 µg/ml.

5. Extracção de DNA

5.1. Extracção de DNA total

5.1.1. Método do tiocianato de guanidina

A extracção de DNA de todos os isolados foi feita a partir de crescimento em meio líquido, utilizando uma adaptação do método de Pitcher *et al.* (1989).

Para cada isolado inocularam-se 50 µl de cultura em 4 ml de BHI e incubou-se a 28°C com agitação, 'overnight'. Centrifugaram-se as células a 6000 g durante 10 min. Desprezou-se o sobrenadante e suspendeu-se o 'pellet' em 1 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Adicionou-se 500 µl de reagente GES (Tocianato de guanidina 5 M, EDTA 100 mM, Sarcosil 0,5% v/v), agitou-se por inversão e colocou-se em gelo 5-10 min, verificando a eficácia da lise através da obtenção de uma solução transparente. Adicionaram-se 250 µl de NH₄Ac 10 M frio, colocou-se em gelo 10 min e adicionou-se 1 ml da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturando por inversão. Centrifugou-se a 18000 g durante 10 min e recuperou-se o sobrenadante, tendo o cuidado de não arrastar a interfase. Para precipitar o DNA adicionou-se igual volume de isopropanol frio, misturou-se por inversão e enrolaram-se os novelos de ácidos nucleicos com uma ansa, mergulhando-os num eppendorf contendo etanol a 70%. Nas amostras em que não se observou a formação de novelos centrifugou-se o sobrenadante a 18000 g, 10 min e lavou-se 'pellet' com 1 ml de etanol a 70%, descartando o sobrenadante após centrifugação. Após 5-10 min de secagem, solubilizaram-se os ácidos nucleicos em 500 µl de TE com RNase (50 µg/ml) e incubou-se num banho a 37°C, durante 30 min. Efectuou-se outra purificação, adicionando 500 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturando por inversão e centrifugando a 18000 g durante 10 min. Ao sobrenadante adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio (NaAC) 3M frio (pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol absoluto frio, misturando por inversão. Centrifugou-se a 18000 g e procedeu-se à solubilização do DNA em 100 µl de TE. Procedeu-se à quantificação do DNA por fotometria (UV1101 Biotech Photometer) através da leitura a 260 e 280 nm. O cálculo da concentração de DNA foi feito através da seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ (ng/}\mu\text{l)} = (\text{A}_{260} \times 50 \times \text{volume total}) / \text{volume DNA}$$

5.1.2. Método de fervura

A extracção de DNA de todos os isolados foi feita utilizando o método adaptado de Sambrook *et al.* (2001).

Inocularam-se os isolados em meio BHI sólido e várias colónias de células foram resuspensas em 100 µl de H₂O. Incubou-se a cultura a 100°C durante 10 min até observação de lise total, verificada através da clarificação da suspensão. Perfez-se o volume a 500 µl com TE, ao qual se adicionaram 500 µl de fenol:clorofórmio:álcool

isoamílico (25:24:1), homogenizando por inversão. Para recolha do DNA centrifugou-se a 18000 g, 5 min e recolheu-se a fase aquosa. Para precipitar o DNA adicionou-se 1/10 do volume de acetato de potássio (KAc) 3M e 1 volume de isopropanol, misturou-se por inversão e incubou-se 5 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 18000 g durante 5 min e lavou-se o 'pellet' com 1 ml de etanol a 70%. Descartou-se o sobrenadante, secou-se o 'pellet' numa estufa a 60°C durante 5 min e ressuspendeu-se em 50-100 µl de TE.

5.2. Extracção de DNA plasmídico

A extracção de DNA plasmídico de todos os isolados foi feita a partir de crescimento em meio líquido, utilizando o método adaptado de Sambrook & Russel (2001).

As culturas foram obtidas por inoculação dos isolados, a partir de meio sólido, em 4 ml de meio BHI e incubou-se a 28°C com agitação, 'overnight'. As células foram recolhidas por centrifugação a 18000 g durante 5 min. Lavaram-se as células com 1 ml de TE e transferiram-se para um tubo eppendorf. Para lisar as células centrifugou-se a 18000 g durante 5 min, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o 'pellet' em 100 µl de Solução Alcalina I (Glucose 50 mM, Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8), agitando vigorosamente. Adicionaram-se 200 µl de Solução Alcalina II (NaOH 0,2 N, SDS 0,02%), diluída no momento a partir da solução stock, misturou-se por inversão e colocou-se em gelo 5 min. Adicionaram-se 150 µl de Solução Alcalina III (KAc 5 M, ácido acético glacial 11,5%), misturou-se por inversão e colocou-se em gelo 5 min. Para precipitação do DNA plasmídico centrifugou-se o lisado a 18000 g durante 5 min e recolheu-se o sobrenadante. Para purificação do DNA obtido adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturou-se por inversão várias vezes, centrifugou-se novamente a 18000 g durante 2 min e recolheu-se o sobrenadante. Adicionaram-se 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente, misturando por inversão e deixou-se o DNA precipitar durante 2 min. Centrifugou-se a 18000 g durante 5 min e adicionou-se 1 ml de etanol 70% frio ao 'pellet', misturando por inversão. Centrifugou-se novamente a 18000 g durante 2 min, descartou-se o sobrenadante e secou-se o 'pellet' a 65°C cerca de 10 min. Ressuspendeu-se o 'pellet' em 50 µl de TE com RNase (50 µg/ml) e conservou-se a -20°C.

6. Identificação a nível de género por PCR-RFLPs do rDNA 16S

Foi utilizada a técnica PCR-RFLPs adaptada de Widmer *et al.* (1998) recorrendo aos 'primers' universais: pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Massol-Deya *et al.*, 1995) e à enzima de restrição de corte frequente *HaeIII*.

6.1. PCR

Foram preparadas as misturas de PCR num volume de reacção de 50 µl, com 200 ng de DNA, Tampão de PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada 'primer' e 1 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen).

A cada tubo de PCR foi adicionada uma gota de óleo mineral e procedeu-se à reacção de amplificação num termociclador Robocycler 96 (Stratagene), de acordo com o seguinte programa de amplificação: um período de desnaturação de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 2 min a 72°C, e um período final de extensão de 5 min a 72°C.

6.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose

Preparou-se um gel de agarose 1% (Invitrogen) em tampão 0,5X TBE (Invitrogen). Aplicaram-se no gel 10 µl de cada reacção de PCR, após adição de 2 µl de 10X corante azul de bromofenol (Takara), e 5 µl de marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). Procedeu-se à electroforese em tampão 0,5X TBE a 90 volts, durante 2 h. Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/ml) e a imagem digitalizada no programa KODAK 1D 2.0.

6.3. RFLPs

Procedeu-se à digestão de uma alíquota de DNA amplificado, num volume final de reacção de 25 µl, com 10 µl de DNA amplificado, 1x Tampão de restrição e 2 U de *HaeIII* (Takara). Incubou-se a reacção de digestão numa estufa a 37°C, durante 3 h.

6.4. Observação dos produtos de RFLPs por electroforese em gel de agarose

Preparou-se um gel de agarose 2,5% (Invitrogen) em tampão 0,5X TBE (Invitrogen). Aplicaram-se no gel 25 µl de cada reacção de PCR, após adição de 2 µl de 10X corante azul de bromofenol (Takara), e 5 µl de marcador de massa molecular 100 bp (Invitrogen). Procedeu-se à electroforese em tampão 0,5X TBE a 90 volts, durante 2 h.

Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/ml) e a imagem digitalizada no programa KODAK 1D 2.0.

7. Identificação a nível de espécie por PCR-RFLPs do gene *iaaL*

Para amplificação do gene *iaaL* e restrição do produto amplificado recorreu-se a uma adaptação do método de Penyalver *et al.* (2000), utilizando os 'primers' específicos IAAL F (5'-GGCACCAGCGGCACC-3') e IAAL R (5'-CGCCCTCGGAACTGCGATAC-3') e a enzima de restrição de corte frequente *HaeIII*.

7.1. PCR

Foram preparadas as misturas de PCR num volume de reacção de 50 µl, com 200 ng de DNA, Tampão de PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,6 µM de cada 'primer' e 1,5 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen).

A cada tubo de PCR foi adicionada uma gota de óleo mineral e procedeu-se à reacção de amplificação num termociclador Robocycler 96 (Stratagene), de acordo com o seguinte programa de amplificação: um período de desnaturação de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 62°C e 1 min a 72°C, e um período final de extensão de 5 min a 72°C.

7.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose

Preparou-se um gel de agarose 1% (Invitrogen) em tampão 0,5X TBE (Invitrogen). Aplicaram-se no gel 10 µl de cada reacção de PCR, após adição de 2 µl de 10X corante azul de bromofenol (Takara), e 5 µl de marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). Procedeu-se à electroforese em tampão 0,5X TBE a 90 volts, durante 1 h. Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/ml) e a imagem digitalizada no programa KODAK 1D 2.0.

7.3. RFLPs

Procedeu-se à digestão de uma alíquota de DNA amplificado, num volume final de reacção de 25 µl, com 5 µl de DNA amplificado, 1x Tampão de restrição e 1 U de *HaeIII* (Takara). Incubou-se a reacção de digestão numa estufa a 37°C, 'overnight'.

7.4. Observação dos produtos de RFLPs por electroforese em gel de agarose

Preparou-se um gel de agarose 2% (Invitrogen) em tampão 0,5X TBE (Invitrogen). Aplicaram-se no gel 25 µl de cada reacção de PCR, após adição de 2 µl de 10X corante azul de bromofenol (Takara), e 5 µl de marcador de massa molecular 100 bp (Invitrogen). Procedeu-se à electroforese em tampão 0,5X TBE a 90 volts, durante 2 h. Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/ml) e a imagem digitalizada no programa KODAK 1D 2.0.

8. Identificação e confirmação dos isolados por Nested-PCR do gene *iaaL*

Recorreu-se à re-amplificação de DNA proveniente do produto de PCR do gene *iaaL* referido no ponto 6.1. através de Nested-PCR, adaptado de Bertolini *et al.* (2003). Utilizaram-se os 'primers' internos específicos definidos por estes autores, IAAL N1 (5'-CTCCCTCTCCAACGTCTT-3') e IAAL N2 (5'-GCCTGATTTTCTTCTG-3'), em isolados confirmados como sendo *P. savastanoi* e em todos os isolados para as quais não se tinha obtido produto de amplificação.

8.1. PCR

Foram preparadas as misturas de PCR num volume de reacção de 50 µl, com DNA amplificado (diluição 1:10) no ponto 6.1., Tampão de PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,6 µM de cada 'primer' e 1,5 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen).

A cada tubo de PCR foi adicionada uma gota de óleo mineral e procedeu-se à reacção de amplificação num termociclador Robocycler 96 (Stratagene), de acordo com o seguinte programa de amplificação: um período de desnaturação de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 52°C e 1 min a 72°C, e um período final de extensão de 5 min a 72°C.

8.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose

Procedeu-se à electroforese em gel de agarose tal como referido no ponto 7.2.

9. Avaliação da diversidade genómica de isolados de *P. savastanoi* por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR

A técnica PCR baseada na amplificação de sequências de DNA repetidas ao longo do genoma, utilizando os 'primers': BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), ERIC2 (5'-AGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3') (Feltman *et al.*, 2001) e REP2 (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') (Louws *et al.*, 1994), foi aplicada aos isolados de *P. savastanoi*, de forma a obter perfis genómicos de 'fingerprint' com potencial diferenciante a nível intra-específico.

9.1. PCR

Os volumes dos reagentes das reacções de PCR e o programa de amplificação utilizados foram os mesmos para ERIC-PCR, BOX-PCR e REP-PCR, só variando o 'primer' em cada reacção de amplificação.

Foram preparadas as misturas de PCR num volume de reacção de 50 µl, com 100 ng DNA, Tampão de PCR 1X, MgCl₂ 4 mM, 200 µM de cada dNTP, 2 µM de 'primer' e 2,5 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen).

A cada tubo de PCR foi adicionada uma gota de óleo mineral e procedeu-se à reacção de amplificação num termociclador Robocycler 96 (Stratagene), de acordo com o seguinte programa de amplificação: um período de desnaturação de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 45°C e 1 min a 72°C, e um período final de extensão de 10 min a 72°C.

9.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose

Preparou-se um gel de agarose 1% (Invitrogen) em tampão 0,5X TBE (Invitrogen). Aplicaram-se no gel 10 µl de cada reacção de PCR, após adição de 2 µl de 10X corante azul de bromofenol (Takara), e 5 µl de marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). Procedeu-se à electroforese em tampão 0,5X TBE a 80 volts, durante 3 h. Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/ml) e a imagem digitalizada no programa KODAK 1D 2.0.

10. Sequenciação do rDNA 16S de alguns isolados de *P. savastanoi* e construção de uma árvore filogenética

Foram utilizados os isolados 2, 6, 7, 10, 37, 57, 60, 68, 85, 88, 92, 101, 128 e 142 e a estirpe de referência *P. savastanoi* CECT 93 para sequenciação de uma região parcial do rDNA 16S.

10.1. PCR

Os 'primers' universais pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Massol-Deya *et al.*, 1995) e 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTT-3') (Muyzer *et al.*, 1996) foram utilizados na reacção de amplificação por PCR de cada uma das estirpes.

Foram preparadas as misturas de PCR num volume de reacção de 50 µl, com 200 ng de DNA, Tampão de PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada 'primer' e 1 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen).

A cada tubo de PCR foi adicionada uma gota de óleo mineral e procedeu-se à reacção de amplificação num termociclador Robocycler 96 (Stratagene), de acordo com o seguinte programa de amplificação: um período de desnaturação de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 1 min a 72°C, e um período final de extensão de 5 min a 72°C.

10.2. Observação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose

Procedeu-se à electroforese em gel de agarose tal como referido no ponto 7.2.

10.3. Purificação dos produtos de PCR

Utilizou-se o Kit 'Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit' (Genomed), para purificação dos produtos de PCR obtidos no ponto 10.1. de acordo com as instruções do fabricante. Seguidamente procedeu-se à visualização de uma alíquota de 5 µl da reacção de PCR purificada por electroforese em gel de agarose tal como referido no ponto 7.2.

10.4. Sequenciação

A sequenciação do produto de amplificação do rDNA 16S das estirpes referidas anteriormente decorreu no "Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos" do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT), recorrendo a um sequenciador automático (CEQ-2000, Beckman). Utilizaram-se os 'primers' universais pA e 907R

referidos no ponto 9. O software SEQ 8000 foi utilizado para visualização dos electroferogramas, correcção e alinhamento das sequências obtidas, dando origem a uma sequência final corrigida, para cada uma das estirpes.

Foi analisada a homologia de cada uma das sequências obtidas através de comparação com sequências disponíveis na base de dados GenBank, no site NCBI (National Center for Biotechnology Information), através de BLASTn (Atshul *et al.*, 1997).

10.5. Construção de uma árvore filogenética

A construção da árvore filogenética foi feita com base nas sequências de rDNA obtidas no ponto 10.4 e em sequências de estirpes de referência disponíveis na base de dados GenBank. O alinhamento das sequências foi feito utilizando o software Clustal X. Os modelos de inferência filogenética 'Neighbour Joining' e Máxima Parcimónia foram aplicados no estudo das relações filogenéticas das estirpes utilizando o software PAUP.



III – Resultados e Discussão

III – Resultados e Discussão

1. Identificação a nível de género através de testes fenotípicos

A recolha de nódulos das variedades Galega Vulgar (GV), Cordovil de Serpa (CS) e Verdeal Alentejana (VA) de *Olea europaea* L. foi efectuada no Alentejo, em sete herdades, nas regiões de Moura, Reguengos e Serpa. Em todas as herdades onde se fez recolha de amostras foi possível constatar que o número de árvores sintomáticas da variedade 'Galega Vulgar' era sempre muito inferior relativamente às variedades 'Cordovil de Serpa' e 'Verdeal Alentejana'.

É de extrema importância que os nódulos sejam jovens, sendo a melhor altura do ano para a sua recolha o início da Primavera ou do Outono. Nódulos mais velhos são geralmente invadidos por bactérias oportunistas que se conseguem desenvolver de uma forma mais rápida, tornando o reconhecimento do patógeno mais difícil.

As pseudomonas patogénicas existem como populações homogéneas, em plantas com lesões jovens o que torna o seu isolamento em cultura um processo relativamente simples. Contudo, algumas formam agregados devido à produção de polissacáridos, difíceis de dispersar, constituindo um entrave ao seu isolamento em meio sólido.

Após processamento dos nódulos, crescimento em placa e purificação das culturas, todos os isolados foram submetidos aos seguintes testes fenotípicos básicos:

- Coloração Gram: permite separar as bactérias em dois grupos, Gram-positivas e Gram-negativas, uma vez que estas diferem no tipo de parede celular. A parede da maioria das bactérias Gram-positivas é uma camada espessa de peptidoglicano enquanto que a parede das Gram-negativas é composta por uma fina camada de peptidoglicano rodeada por uma camada externa de proteínas e lipopolissacáridos;
- Detecção de actividade da enzima catalase: a acumulação de peróxido de hidrogénio e, em alguns casos, superóxido extremamente tóxico produzidos durante a respiração aeróbia, por degradação de carboidratos para produção de energia, pode resultar em morte celular, a menos que o microrganismo que as produz seja capaz de as degradar enzimaticamente. Microrganismos capazes de produzir catalase rapidamente degradam estes compostos tóxicos. Por outro lado, a incapacidade de degradação destes compostos por microrganismos anaeróbios estritos, faz com que não sejam capazes de crescer na presença de oxigénio.

- Detecção de actividade da enzima oxidase: A enzima citocromo oxidase desempenha um papel vital no sistema de transporte de electrões durante a respiração aeróbia, catalisando a oxidação de um citocromo reduzido, resultando na formação de H_2O ou H_2O_2 .
- Detecção de actividade da enzima aminopeptidase: a L-alanina aminopeptidase é uma enzima que se localiza no invólucro celular de bactérias e cuja actividade é relevante praticamente exclusiva em microrganismos Gram-negativos. Esta enzima degrada vários substratos com a consequente obtenção do aminoácido L-alanina. Os resultados indicam haver uma correlação significativa entre o resultado deste teste e o comportamento Gram dos microrganismos.
- Pesquisa de produção de pigmentos fluorescentes em *Pseudomonas*: utilização do meio de cultura *Pseudomonas* Agar P, que estimula a produção de piocianina e/ou piorubina, reduzindo a formação de fluoresceína, e o meio de cultura *Pseudomonas* Agar F que estimula a produção de fluoresceína, reduzindo a formação de piocianina e/ou piorubina. A utilização simultânea destes dois meios de cultura permite uma rápida identificação preliminar da maior parte das espécies de *Pseudomonas*, uma vez que algumas estirpes só sintetizam piocianina, outras fluoresceína, e em casos raros, ambos os pigmentos em simultâneo.

Com base nos resultados destes testes fenotípicos aplicados aos 169 isolados, 25 foram eliminados por serem Gram-positivos ou por não serem bastonetes e os restantes 144 foram considerados como membros do género *Pseudomonas*. É de salientar a diversidade morfológica no que diz respeito à cor e tamanho das colónias em meio sólido, bem como da dimensão dos bastonetes apresentada pelos diferentes isolados, através de observação microscópica.

No que se refere à actividade das enzimas catalase e aminopeptidase obtiveram-se 100% de resultados positivos, o que está de acordo com o esperado para *P. savastanoi*. Relativamente à actividade da enzima oxidase, 73% revelaram-se positivos. *P. savastanoi* já foi considerada como patovar de *P. syringae*, sendo o teste da oxidase positivo para esta espécie. Verificou-se assim, que os patovares *glycinea*, *morsprunorum*, *tomato* e *syringae* das estirpes de referência de *P. syringae* incluídos neste estudo são oxidase positivos. Não será, por isso de estranhar que a maioria dos isolados tenha dado resultados positivos em relação à actividade da enzima oxidase, apontando contudo estes resultados para a existência de diversidade intra específica.

Relativamente à produção de fluorescência, apenas 10% dos isolados produzem pigmentos em pelo menos um dos meios testados (*Pseudomonas* Agar F e *Pseudomonas* Agar P). Contudo, a produção de pigmentos fluorescentes não é um critério determinante na identificação do género *Pseudomonas*. Todas as estirpes de referência pertencentes a este género apresentam fluorescência em meio *Pseudomonas* Agar F, e coloração salmão em meio *Pseudomonas* Agar P, excepto as estirpes de referência de *P. savastanoi*. No entanto a estirpe tipo de *P. savastanoi* apresenta coloração salmão em meio *Pseudomonas* Agar P, enquanto que as outras duas estirpes de referência desta espécie não produzem pigmentos em nenhum dos meios testados. Portanto, estes resultados levam a crer que os isolados que não produzem pigmentos fluorescentes podem pertencer a *P. savastanoi*.

Os resultados fenotípicos para os 144 isolados considerados como pertencentes ao género *Pseudomonas* encontram-se na Tabela A em anexo.

No que se refere à diversidade em *P. savastanoi*, Iacobellis *et al.* (1993) verificaram que o isolamento de estirpes de nódulos de oliveira, bem como do filoplano, deu origem a culturas puras de bactérias com características fenotípicas diferentes das estirpes típicas isoladas de oliveira, concluindo-se que esta espécie não é homogénea. Foi também demonstrado por Ercolani (1993) que a maioria dos isolados de *P. savastanoi* recolhidos de folhas em diferentes alturas do ano revelam baixos valores de similaridade fenotípica.

2. Identificação a nível de espécie através de testes bioquímicos

Os testes utilizados foram aplicados a 50 isolados seleccionados aleatoriamente, com o objectivo de obter uma identificação a nível de espécie e, simultaneamente, avaliar a diversidade fenotípica.

O sistema API 20 NE (bioMérieux) é um micro-método de testes bioquímicos e de assimilação que permite a identificação de bastonetes Gram-negativos, não fastidiosos, que não pertençam à família *Enterobacteriaceae*, como é o caso das bactérias do género *Pseudomonas*. Estes microrganismos são não fermentativos e aeróbios estritos.

Dos 20 testes presentes nas galerias API 20 NE, apenas em dois testes os 50 isolados apresentaram resultados idênticos, enquanto que para os restantes se obteve uma variabilidade de resposta (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados das galerias API 20NE (50 isolados).

Testes galerias API 20NE	Resultados (% positivos)
Oxidação da glucose	100
Assimilação de gluconato e malato	
Redução de nitratos a nitritos	90
Assimilação de arabinose, manitol e manose	
Presença de β -galactosidase	
Assimilação de N-acetil-glucosamina e citrato	80
Hidrólise da esculina	
Assimilação da maltose	50
Assimilação de adipato	
Fermentação da arginina	0
Produção de indole	
Assimilação de fenil-acetato	
Hidrólise da ureia	10
Hidrólise da gelatina	
Assimilação de carpato	
Fermentação da glucose	20
Presença de citocromo oxidase	

De acordo com a tabela de resultados previstos (bioMérieux) para várias espécies do género *Pseudomonas*, nomeadamente *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. putida* e *P. stutzeri*, verifica-se que todas as espécies oxidam glucose (98-100%), assimilam gluconato (98-100%), carpato (87-100%), malato (98-100%) e citrato (85-100%), fermentam arginina (80-94%) e possuem citocromo oxidase (98-100%), e que praticamente nenhuma (0-1%) produz indole, fermenta glucose, hidrolisa esculina e possui β -galactosidase. Para os restantes testes obtêm-se resultados muito variáveis consoante a espécie. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para as estirpes de referência *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. stutzeri* incluídas neste estudo.

Os resultados obtidos relativamente aos isolados incluídos neste estudo utilizando as galerias API 20NE são concordantes com os resultados referidos acima para oxidação da glucose, assimilação de gluconato, malato e citrato, produção de indole e fermentação da glucose. No entanto, os testes de hidrólise da esculina, presença de β -galactosidase, assimilação de carpato, fermentação da arginina e presença de citocromo oxidase revelaram resultados contrários aos descritos.

Já Alvarez *et al.* (1998) tinham descrito que, no caso de *P. savastanoi*, apenas os testes de oxidação da glucose (+), fermentação da arginina (-), produção de indole (-), fermentação da glucose, hidrólise da ureia (-) e presença de β -galactosidase (-) originaram resultados homogêneos e concordantes com os previstos para outras espécies do género *Pseudomonas* (bioMérieux). Excluindo o teste da fermentação da arginina e da hidrólise da ureia, que originaram respectivamente 100% e 10% de resultados positivos contrariamente ao esperado para as outras espécies do mesmo género, este foi também o resultado obtido para os 50 isolados incluídos no presente estudo e para a estirpe de referência *P. savastanoi* CECT 93.

Assim, pode-se assumir que os isolados utilizados neste estudo podem pertencer a outra espécie de *Pseudomonas*, não incluída nas galerias API 20 NE. O resultado obtido para a fermentação da arginina aproxima mais estes isolados de *P. savastanoi*.

Utilizaram-se testes de assimilação de fontes de carbono com base nas galerias API 50 CH, para os mesmos isolados, de forma a complementar os resultados obtidos até ao momento.

Nos 24 testes de assimilação de fontes de carbono, com excepção da oxidação da glucose, observou-se variabilidade de resposta no grupo dos 50 isolados analisados (Tabela 6). No entanto, para testes comuns às galerias API 20 NE os resultados obtidos foram concordantes.

Tabela 6. Resultados dos testes de assimilação de fontes de carbono (50 isolados).

Testes de assimilação de fontes de carbono	Resultados (% positivos)
Oxidação da glucose	100
Assimilação de arabinose, galactose, manitol, manose e xilose	90
Assimilação de citrato	80
Assimilação de celobiose, ribose, sacarose, trealose e inositol	60
Assimilação de glicerol	50
Assimilação de adonitol, rafinose, sorbitol e turanose	0
Assimilação de sorbose	10
Assimilação de eritritol e melezitose	20
Fermentação da glucose	
Assimilação de frutose, fucose e ramnose	40

O estudo realizado por Alvarez *et al.* (1998) para 160 estirpes de *P. savastanoi*, referido anteriormente, mostrou que apenas 27 dos testes incluídos nas galerias API 50CH revelaram resultados concordantes para todas as estirpes. Os restantes resultados variaram consoante a estirpe.

Neste estudo, dos doze testes em comum com os utilizados pelos autores, seis foram concordantes, nomeadamente a assimilação de manose (+), glicerol (+), sorbose (-), fucose (-), ramnose (-) e turanose (-). No entanto, quatro foram discordantes, nomeadamente a assimilação de frutose (+), sorbose (-), celobiose (-) e fucose (-). Os testes de assimilação de arabinose e xilose, para os quais se obteve no presente estudo 90% de resultados positivos, estão incluídos nos testes descritos como sendo muito heterogêneos.

Tendo em conta os testes comuns às galerias API 20NE e aos testes de assimilação de fontes de carbono, utilizados neste estudo, pode ainda verificar-se que existe concordância entre os dois para a oxidação da glucose, assimilação de arabinose, citrato, manitol e manose e fermentação da glucose. Assim pôde-se confirmar a homogeneidade destas características fenotípicas nos isolados utilizados neste estudo. A diversidade intra-específica obtida relativamente a algumas das

características fenotípicas era esperada, tendo em conta que vários autores referem estas variações dentro da espécie *P. savastanoi*. Alguns autores atribuem-nas a factores ambientais (Ercolani, 1983), enquanto outros pensam tratar-se de diferentes patovares (Young & Triggs, 1994).

Apesar de se ter verificado variabilidade nos testes bioquímicos utilizados, estes constituem uma componente importante quando se pretende aplicar uma abordagem polifásica.

Os testes fenotípicos clássicos são relativamente morosos e os resultados que daí advêm, ainda que muitas vezes suficientes para identificar o género a que pertencem os isolados, não são suficientes para identificar a espécie. Deste modo, torna-se imprescindível recorrer a testes moleculares.

3. Produção de ácido indoleacético (IAA)

O envolvimento da fitohormona ácido indoleacético (IAA) na patogenicidade foi já claramente demonstrada para a espécie *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Glickman *et al.*, 1998).

Atendendo ao facto de a produção de ácido indoleacético (IAA) por *P. savastanoi* estar directamente associada com a capacidade de virulência desta bactéria e de a via de síntese deste composto apresentar várias funções incluindo a destoxificação de vários compostos, capazes de inibir o seu crescimento, pesquisou-se a produção deste composto *in vitro*.

O método utilizado permitiu quantificar a produção de IAA num conjunto de 44 isolados, aos quais também se aplicaram os testes bioquímicos referidos no ponto 2, e comparar os níveis de produção relativamente às estirpes de referência *P. savastanoi* DSMZ 50298^T e *P. savastanoi* CECT 93.

Obtiveram-se diferentes níveis de produção de IAA, existindo no entanto um conjunto de isolados para os quais o nível de produção deste composto é próximo dos obtidos para as estirpes de referência referidas. No entanto devido à heterogeneidade dos valores obtidos optou-se por agrupar os restantes isolados em quatro grupos (Figura 6).

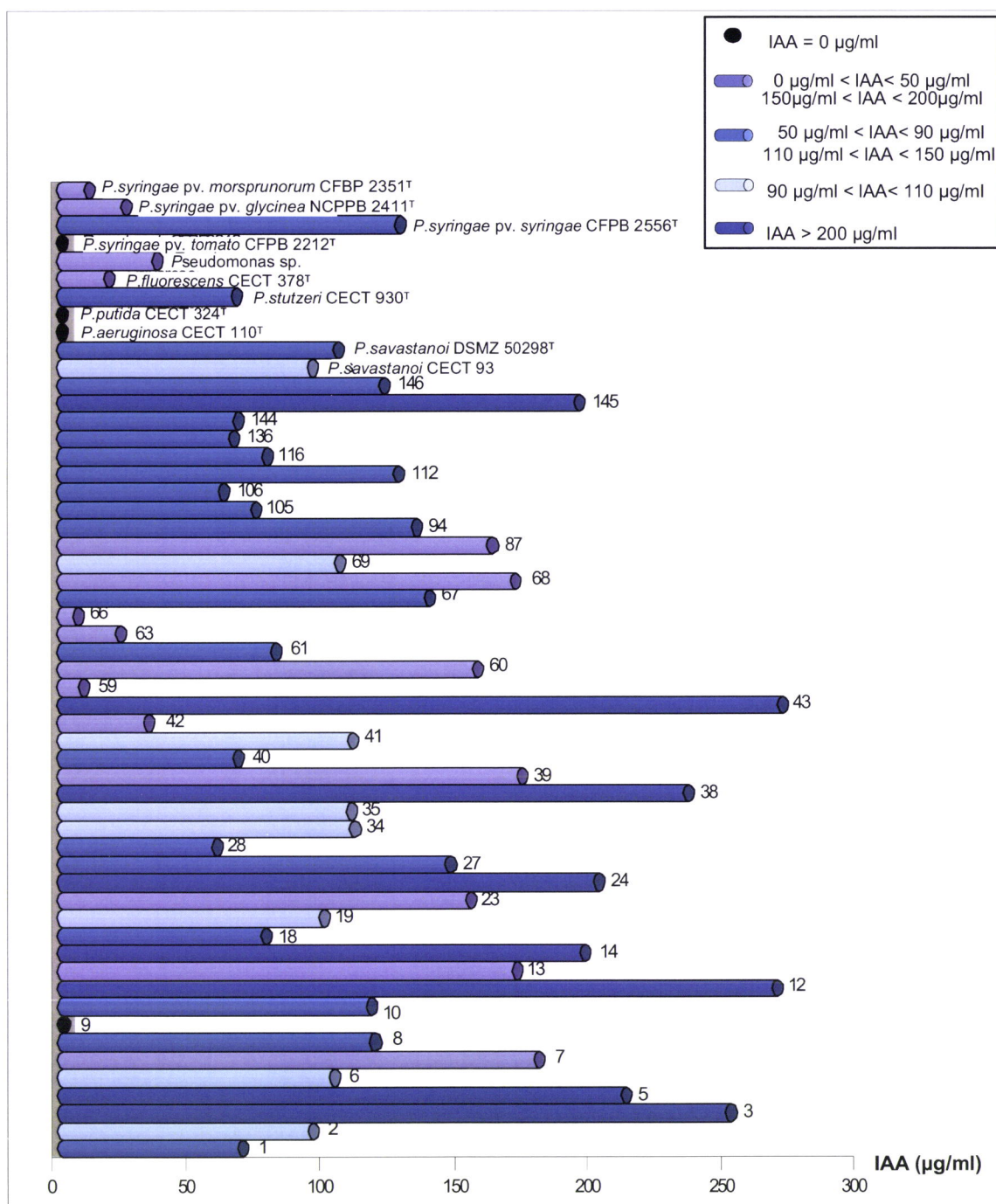


Figura 6: Produção de IAA (µg/ml) em isolados obtidos a partir de nódulos de oliveira e em estirpes de referência do género *Pseudomonas*.

É de salientar que tanto para o isolado 9 como para as estirpes de referência *P. syringae* pv. *tomato*, *P. putida* e *P. aeruginosa* não se detectou produção de IAA. Almonacid *et al* (2000), utilizando a mesma técnica colorimétrica, detectaram superprodução de IAA numa estirpe de referência de *P. putida*. Tendo em conta os resultados obtidos por estes autores, os resultados negativos podem não significar ausência de produção, mas sim níveis inferiores aos limites do método nas condições aplicadas.

Poder-se-ia partir do princípio que todos os isolados para os quais se verificou a produção de IAA pertencem à espécie *P. savastanoi*, uma vez que foram obtidos a partir de nódulos de oliveira e sintetizam este composto. Neste ensaio verificou-se que estirpes de referência, correspondentes a espécies que não se encontram descritas como sendo patogénicas para a oliveira, produzem IAA. *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, caracteriza-se por produzir IAA através de uma via metabólica exclusiva desta espécie. Deste modo, seria necessário efectuar um ensaio adicional de forma a determinar a via biossintética envolvida na síntese de IAA, tanto para estirpes de referência como para os isolados estudados, para se poder correlacionar a produção de IAA com *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. No entanto, como não se estudou a via pela qual o composto é produzido e dado que outras espécies fitopatogénicas, como por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas syringae* também produzem IAA (Patten & Glick, 2000), os resultados obtidos são indicativos e não determinantes a nível de espécie. Pode-se observar através do gráfico da Figura 6, que três patovares de referência de *P. syringae* produzem IAA e ainda que as estirpes das espécies *P. fluorescens*, *P. stutzeri* e *Pseudomonas* sp. também possuem capacidade de síntese do composto.

A análise adicional efectuada com os resultados obtidos demonstrou ainda que não existe correlação entre os valores de produção de IAA relativamente à região de recolha das amostras ou às variedades das árvores de onde foi feita a amostragem.

4. Identificação a nível de género por PCR-RFLPs do rDNA 16S

O gene de rRNA16S do operão ribossomal é frequentemente utilizado em estudos moleculares dado a sua sequência ser muito conservada intra-especificamente e, em alguns casos, até a nível de género. A análise das relações filogenéticas do género *Pseudomonas* e as reavaliações taxonómicas permitiram o agrupamento das diferentes espécies em grupos de similaridade rRNA, baseadas em estudos de hibridação rRNA/DNA. Deste modo, *P. savastanoi* inclui-se no grupo rRNA I tal como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* e *P. stutzeri*, sendo consideradas como membros de um grupo filogenético homogéneo.

O agrupamento dos isolados de acordo com a sequência do gene de rRNA 16S foi testado por PCR-RFLPs. Widmer *et al.* (1998) utilizaram um protocolo de PCR-RFLPs específico para a amplificação de rDNA 16S, na detecção selectiva de *Pseudomonas* (*sensu strictu*) em amostras ambientais, pertencentes ao grupo rRNA I. Este protocolo pode também ser utilizado como um método rápido na identificação a nível de género. A amplificação baseia-se na utilização de um par de 'primers' muito específicos obtidos a partir da pesquisa de sequências disponíveis na base de dados 'The Ribossomal Database Project' e digestão do produto amplificado com a enzima de restrição *HaeIII*. Foi testada também a amplificação de rRNA 16S com 'primers' universais que produziram um fragmento de 1000 bp e digestão dos produtos amplificados com a enzima *HaeIII*, originando um perfil de restrição com três fragmentos, com massas moleculares de aproximadamente 650 bp, 200 bp e 150 bp, para todas as espécies de *Pseudomonas* do grupo rRNA I testadas e distinto dos perfis obtidos para espécies pertencentes a outro grupo de rRNA ou a outro género.

Dentro deste contexto, desenvolveu-se uma estratégia semelhante para tentar agrupar os isolados e averiguar a sua inclusão no grupo rRNA I. Pesquisaram-se na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) sequências de rRNA 16S de algumas espécies de *Pseudomonas*, nomeadamente de todas as estirpes de referência utilizadas. O estudo teórico sobre a restrição destas sequências com a enzima *HaeIII*, utilizando o software WebCutter, permitiu concluir que os fragmentos de 682 bp, 220 bp e 171 bp, 163 bp e 145 bp serão comuns para *Pseudomonas* spp. do grupo rRNA I.

Após amplificação do rDNA 16S das estirpes de referência *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. savastanoi*, *P. syringae* e *P. stutzeri* com 'primers' universais, obteve-se um fragmento com cerca 1500 bp. Para todas as estirpes

referidas, a restrição do produto amplificado com a enzima *Hae*III deu origem ao perfil característico. Perante estes resultados, foi utilizada a mesma metodologia para 30 isolados tendo sido obtidos três perfis diferentes e distintos do perfil I de referência (Tabela 7). Na Figura 7 encontram-se representados exemplos para cada um dos perfis de restrição obtidos.

Tabela 7: Perfis de restrição do rDNA 16S obtidos para as estirpes de referência e isolados testados.

Perfil de restrição rDNA 16S	Dimensão dos fragmentos obtidos	Isolados testados
I	680 bp, 220 bp e 170 bp, 160 bp, 145 bp	*
II	320 bp, 220 bp, 200 bp, 170 bp, 160 bp	7, 8, 18, 39, 77, 85, 94, 108, 128
III	320 bp, 280 bp, 200 bp, 170 bp, 160 bp	1, 12, 13, 28, 37, 40, 44, 50
IV	320 bp, 280 bp, 180 bp, 160 bp	2, 5, 6, 19, 22, 24, 34, 43, 46, 67, 68, 105, 112

* Perfil das estirpes de referência incluídas no estudo

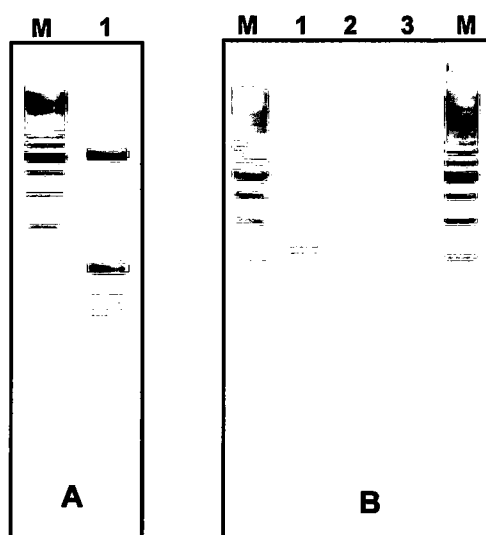


Figura 7: Perfis de restrição do rDNA 16S.

M- Marcador molecular 100 bp (Invitrogene)

A – Perfil I característico para estirpes de referência de *Pseudomonas*

B- Perfis obtidos para os isolados testados.

1- Perfil II

2- Perfil III

3- Perfil IV

A variabilidade intrínseca do gene de rRNA 16S obtida para a população de isolados em estudo é claramente superior à esperada para membros da mesma espécie, tendo em conta que estirpes de referência de espécies diferentes apresentam inclusivamente o mesmo perfil. Os polimorfismos detectados nos isolados testados levam a considerar a hipótese de que estes podem pertencer a espécies ou géneros diferentes. A utilização desta metodologia apesar de agrupar os isolados, não permitiu garantir que se trata de membros do grupo de similaridade de rRNA I.

5. Identificação a nível de espécie por PCR-RFLPs do gene *iaaL*

A amplificação e restrição do gene *iaaL* permitem uma rápida identificação de *P. savastanoi*, sendo discriminante relativamente a outras bactérias, uma vez que baseia na amplificação de um gene muito conservado. Este gene apresenta uma menor variabilidade intrínseca, atendendo ao facto de estar associado à patogenicidade. A utilização de 'primers' específicos origina um produto de amplificação de 454 bp e o respectivo perfil de restrição com a enzima *HaeIII* origina dois fragmentos de 279 br e 175 bp, característicos desta espécie.

Dos 144 isolados previamente seleccionados através de caracterização fenotípica, apenas 20 foram inicialmente identificados como *P. savastanoi* aplicando esta metodologia. Utilizou-se DNA total extraído pelo método adaptado de Pitcher *et al.* (1989), através do qual se pode obter DNA com um elevado grau de pureza. No entanto, e apesar das características fenotípicas semelhantes, não se obteve produto de amplificação para o gene *iaaL* nos restantes isolados.

Devido ao escasso número de resultados positivos, foi testado um outro método mais simples de extracção de DNA, adaptado de Sambrook *et al.* (1989). Este é um método eficiente de extracção de DNA em bactérias Gram-negativas, não se obtendo no entanto um DNA tão intacto e puro como no método referido acima, mas aumentando o rendimento da extracção. É ideal para aplicação de métodos rotineiros de biologia molecular, como sendo a utilização de técnicas baseadas em PCR. A amplificação do gene *iaaL* utilizando este método revelou ser mais eficaz, aumentando para 51 o número de resultados positivos.

Encontra-se descrito que o gene *iaaL* tanto se pode localizar no cromossoma como em plasmídeos, dependendo do isolado e do hospedeiro que infecta. De acordo com alguns autores, os genes responsáveis pela produção de IAA encontram-se

organizados num operão plasmídico em estirpes isoladas de oleandro, mas parecem localizar-se no cromossoma no caso de estirpes isoladas de oliveira (Penyalver *et al*, 2000; Glass & Kusage, 1988; Surico *et al*, 1985).

Outros autores defendem a localização estritamente plasmídica em ambos os casos (Glickman *et al*, 1998; Comai & Kosuge, 1983). Ainda assim existem diferenças significativas entre estirpes relativamente à dimensão do plasmídeo onde se encontram os genes responsáveis pela produção de IAA. Em duas estirpes de *P. savastanoi*, EW2009 e EW2015, isoladas de oleandro, os genes responsáveis pela produção de IAA localizam-se no plasmídeo pIAA1 de 52 kb, enquanto que na estirpe PB205, isolada de oliveira, estes genes se encontram no plasmídeo pIAA2 de 72 kb, de acordo com Comai & Kosuge (1983).

Em bactérias, muitas vezes os genes associados à virulência encontram-se preferencialmente em plasmídeos e não no DNA genómico. Assim e dada a controvérsia no que diz respeito à localização dos genes responsáveis pela produção de IAA em isolados de oliveira e face ao baixo número de resultados positivos obtidos na amplificação deste gene utilizando DNA total, procedeu-se à extracção de DNA plasmídico, utilizando o método adaptado de Sambrook & Russel (2001). Este método de extracção é bastante simples e eficaz, permitindo efectuar posteriormente testes moleculares com resultados fiáveis.

Foi possível, através da utilização de DNA plasmídico amplificar o gene *iaaL* em 26 isolados, dos quais 18 isolados já tinham dado resultado positivo utilizando DNA total e 8 isolados para os quais não se tinha ainda obtido produto de amplificação.

Para alguns isolados, como resultado da amplificação, obteve-se não só o fragmento característico correspondente a 454 bp, mas também outros fragmentos. Estes isolados não foram considerados como membros pertencentes a esta espécie, tendo em conta o estudo efectuado por Penyalver *et al* (2000). Para as estirpes de referência *P. savastanoi*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. stutzeri* foi obtido o fragmento de amplificação característico para *P. savastanoi*. Para a estirpe de referência *P. putida*, para além do fragmento de dimensão esperada, obteve-se um fragmento de dimensão superior. Na Figura 8 estão representados exemplos dos produtos de amplificação obtidos para alguns isolados e estirpes de referência.

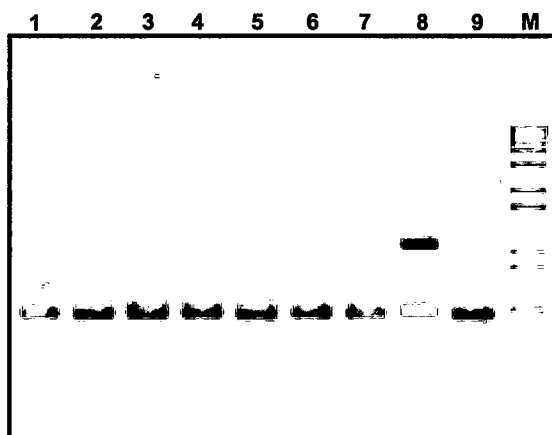


Figura 8: Gel de amplificação do gene *iaaL*.

M: Marcador 100 bp (Invitrogene);

1: *P. savastanoi* CECT 932;

2: isolado 6;

3: isolado 7;

4: isolado 37;

5: isolado 60;

6: *P. aeruginosa* CECT 110^T;

7: *P. fluorescens* CECT 378^T;

8: *P. putida* CECT 324^T;

9: *P. stutzeri* CECT 930^T

Na análise de restrição do gene *iaaL* foram seleccionados todos os isolados e estirpes de referência para as quais se obteve o fragmento de amplificação esperado. A digestão dos produtos amplificados com a enzima de restrição *HaeIII*, originou os dois fragmentos de 279 bp e 175 bp, característicos de *P. savastanoi*. A estirpe de referência *P. putida*, segundo os estudos efectuados por Penyalver *et al* (2000), deveria originar dois fragmentos de restrição com 310 bp e 130 bp, perfeitamente distintos do perfil de *P. savastanoi*. Contrariamente, neste estudo apesar ter havido digestão incompleta, *P. putida* apresenta o perfil de restrição característico de *P. savastanoi* (Figura 9). O facto de em *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. stutzeri* (Figuras 8 e 9) se terem observado os fragmentos de amplificação e restrição esperados para *P. savastanoi* levanta a questão da fiabilidade desta metodologia enquanto método de identificação. No entanto como todos os isolados foram obtidos a partir de nódulos de oliveira, sem dúvida locais de infecção que indicam a presença de *P. savastanoi*, esta questão poderá não ser relevante.

Este ensaio resultou na obtenção do perfil característico de amplificação e restrição do gene *iaaL* para 63 isolados. Para 8 destes isolados, assumiu-se que a localização do gene seja exclusivamente plasmídica, dado que só se obtiveram resultados positivos utilizando DNA plasmídico. Para 18 dos isolados, os resultados foram positivos quer a partir de DNA total, quer a partir de DNA plasmídico. Dada a possibilidade de contaminação do DNA total com DNA plasmídico, a localização do gene nestes isolados deverá ser plasmídica. Para os restantes 27 isolados, para os quais só se obtiveram resultados positivos utilizando DNA total, assumiu-se que a localização do gene é cromossomal. Estes resultados não revelam uma correlação entre a localização do gene *iaaL* e o hospedeiro, tendo em conta que todos os isolados foram obtidos de oliveira, nem tão pouco que a localização deste gene é cromossomal

nestes isolados, como tem vindo a ser descrito por vários autores (Penyalver *et al*, 2000; Glass & Kusage, 1988; Surico *et al*, 1985).

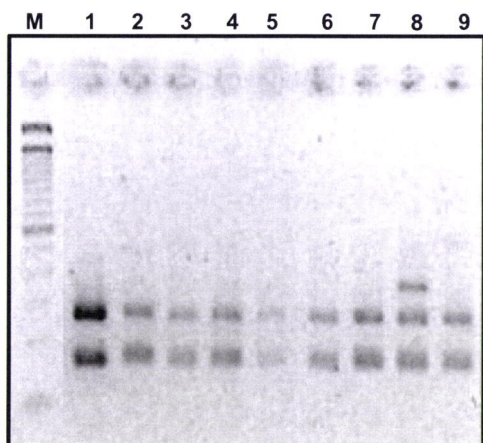


Figura 9: Gel de restrição do gene *iaaL*.

M: Marcador 100 bp (Invitrogene);

1: *P. savastanoi* CECT 932;

2: isolado 6;

3: isolado 7;

4: isolado 37;

5: isolado 60;

6: *P. aeruginosa* CECT 110^T;

7: *P. fluorescens* CECT 378^T;

8: *P. putida* CECT 324^T;

9: *P. stutzeri* CECT 930^T

6. Identificação e confirmação dos isolados por Nested-PCR do gene *iaaL*

A técnica Nested-PCR baseia-se na amplificação de uma sequência alvo, a partir de um primeiro produto de PCR, através da utilização de um conjunto de 'primers' internos que amplificam um fragmento de dimensão inferior. Esta técnica permite aumentar o rendimento e a especificidade do produto esperado, bem como a sensibilidade na sua deteção.

Aplicou-se esta metodologia na identificação de isolados para os quais não se obteve anteriormente produto de amplificação para o gene *iaaL* e na confirmação de isolados previamente identificados, utilizando DNA total e plasmídico.

Recorrendo à amplificação do gene *iaaL* por Nested-PCR, obteve-se o fragmento correspondente a 338 bp, característico para *P. savastanoi*. Utilizando DNA total foi possível identificar 25 isolados e confirmar os resultados obtidos por PCR-RFLPs para 22 isolados. Utilizando DNA plasmídico foi possível identificar 14 isolados e confirmar os resultados obtidos por PCR-RFLPs para 26 isolados.

Segundo Penyalver *et al.* (2000), a sequência do gene *iaaL* de *P. savastanoi* não apresenta homologia com nenhuma outra sequência disponível nas bases de dados. Através de estudos de hibridação, Glickman *et al.* (1998) detectaram a presença do gene *iaaL* em plasmídeos de vários patovares de *P. savastanoi* e *P. syringae*, o que

contraria os dados referidos acima e vai de encontro aos resultados obtidos neste estudo para estirpes de referência de outras espécies, nomeadamente nos patovares de *P. syringae* (Figura 10).

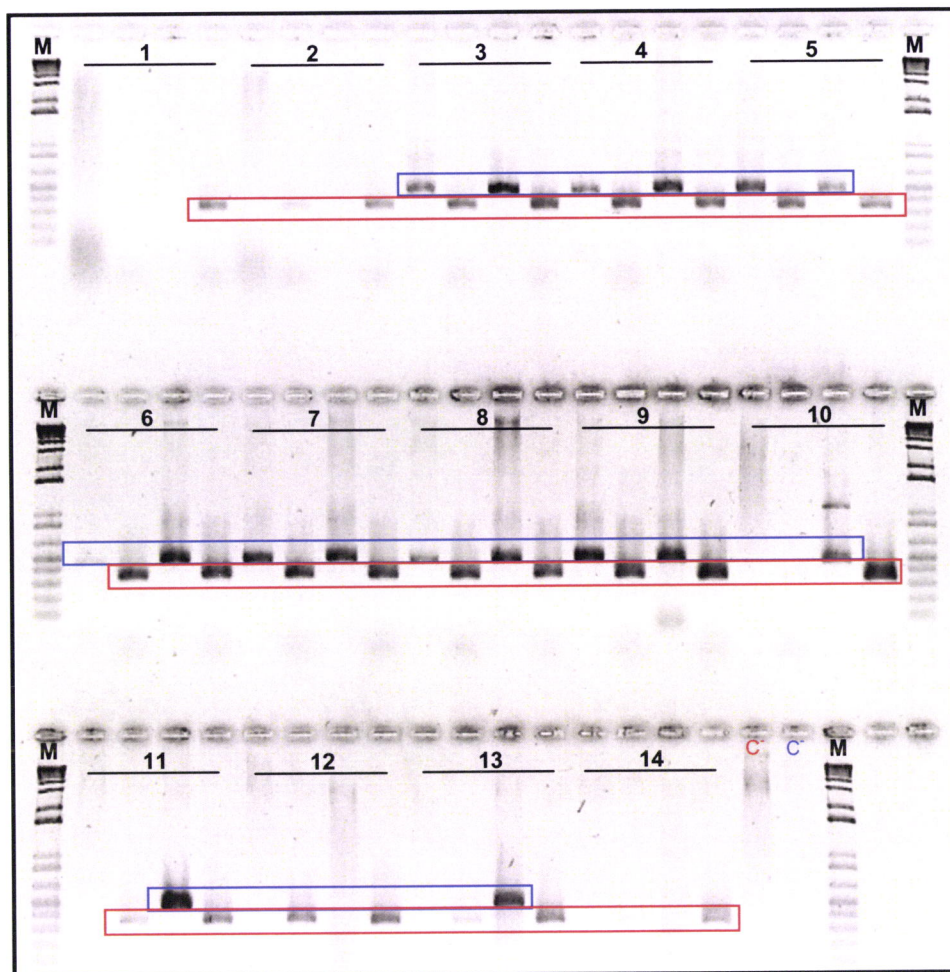


Figura 10: Gel de amplificação do gene *iaaL* com os 'primers' F/R e re-amplificação com os 'primers' N1/N2 em estirpes de referência. Para cada estirpe, as duas primeiras 'lanes' representam amplificação a partir de DNA total e as duas seguintes a partir de DNA plasmídico. 1: *Pantoea agglomerans*; 2: *Erwinia toletana*; 3: *P. savastanoi* CECT 93^T; 4: *P. savastanoi* DSMZ 50298^T; 5: *P. savastanoi* NCPB 2327; 6: *P. aeruginosa* CECT 110^T; 7: *P. putida* CECT 324^T; 8: *P. stutzeri* CECT 930^T; 9: *P. fluorescens* CECT 378^T; 10: *Pseudomonas* sp.; 11: *P. syringae* pv. *tomato* CFBP 2212^T; 12: *P. syringae* pv. *syringae* CFBP 2556^T; 13: *P. syringae* pv. *glycinea* NCPPB 2411^T; 14: *P. syringae* pv. *morsprunorum* CFBP 2351^T

A presença de outras espécies de *Pseudomonas* em simultâneo com *P. savastanoi* em nódulos de oliveira não se encontra descrita. Contudo, está já referenciado que o rápido desenvolvimento de bactérias saprófitas ou oportunistas ocorre. É o caso de *Pantoea agglomerans* e *Erwinia toletana*, com algumas características fenotípicas idênticas a *Pseudomonas*, que podem reduzir a eficiência de plaqueamento e isolamento de *P. savastanoi*, mesmo utilizando meios semi-selectivos (Penyalver *et al*, 2000; Rojas *et al*, 2004).

Perante estes factos foram incluídas ainda neste estudo estirpes de referência de *Pantoea agglomerans* e *Erwinia toletana* e os resultados positivos obtidos levantam uma questão preocupante relativamente à fiabilidade das identificações obtidas, levantando a hipótese de que a técnica utilizada não é suficientemente discriminante na identificação dos isolados.

Assim, face aos resultados obtidos e à falta de consenso entre diferentes autores, foram seleccionados 87 isolados, identificados como presuntivamente *P. savastanoi*, para serem submetidos posteriormente a testes moleculares.

Os resultados de PCR-RFLPs e Nested-PCR para todos os isolados considerados como *P. savastanoi* encontram-se na Tabela B em anexo.

7. Avaliação da diversidade genómica dos isolados de *P. savastanoi* por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR

Famílias de pequenas sequências de DNA repetidas e muito conservadas encontram-se distribuídas no genoma de várias espécies de bactérias, podendo ser utilizadas na distinção e classificação de estirpes de uma mesma espécie, gerando perfis de DNA que funcionam como ‘fingerprints’ específicos. Estas sequências podem ser divididas em três famílias, que não apresentam homologia significativa entre si. A primeira família engloba os elementos palindrômicos repetitivos extragénicos (REP), a segunda família inclui as sequências do consenso intergénico repetitivo de enterobacteriáceas (ERIC) e a terceira família abrange os elementos BOX. As sequências REP, ERIC e BOX desempenham um papel importante na organização do genoma bacteriano e esta organização tende a ser moldada por fenómenos de selecção. A forma como estas sequências se encontram dispersas no genoma pode ser indicativa dos fenómenos evolutivos que ocorreram (Louws *et al.*, 1994).

Os métodos de tipificação molecular utilizando sequências repetidas em genomas de procariotas têm sido aplicados ao género *Pseudomonas*, tanto para identificação como para diferenciação. Os estudos de variabilidade baseiam-se nos polimorfismos de dimensão existentes em determinadas regiões do genoma, reflectidos pelos perfis de bandas obtidos. As técnicas utilizadas baseiam-se na amplificação das diferentes regiões consenso repetidas ao longo do genoma, permitindo assim obter um 'pool' de fragmentos que reflecte a sua variabilidade genética, permitindo avaliar a diversidade de uma população dentro de uma espécie. É ainda possível distinguir populações, que não são distinguíveis por características fenotípicas, metabólicas e de patogenicidade.

A amplificação das sequências BOX, ERIC e REP por PCR dos isolados presuntivamente identificados como *P. savastanoi*, teve como principal objectivo a utilização de uma técnica molecular simples, fiável e eficaz que permitisse a definição de raças fisiológicas correlacionáveis com a variedade, a herdade e/ou a região da recolha das amostras, dada a dificuldade e complexidade na análise de resultados quando se utilizam métodos baseados em características fenotípicas, bioquímicas e testes de patogenicidade.

Analisando os perfis obtidos para 13 dos isolados identificados *à priori* como *P. savastanoi* (Figura 11), verifica-se que em todas as técnicas se obtiveram perfis com poucos fragmentos, o que parece revelar um baixo poder discriminante intra-específico. Tendo em conta que estão representados no gel da Figura 10 os mesmos isolados utilizando BOX, ERIC e REP-PCR, pode observar-se, por exemplo, que as amostras de 1 a 6 apresentam perfis muito semelhantes aplicando as técnicas BOX-PCR e REP-PCR e mais distintos através da técnica ERIC-PCR, acontecendo o mesmo para as amostras 9 e 10. As amostras 7, 8, 12 e 13 apresentam perfis muito semelhantes com qualquer uma das técnicas.

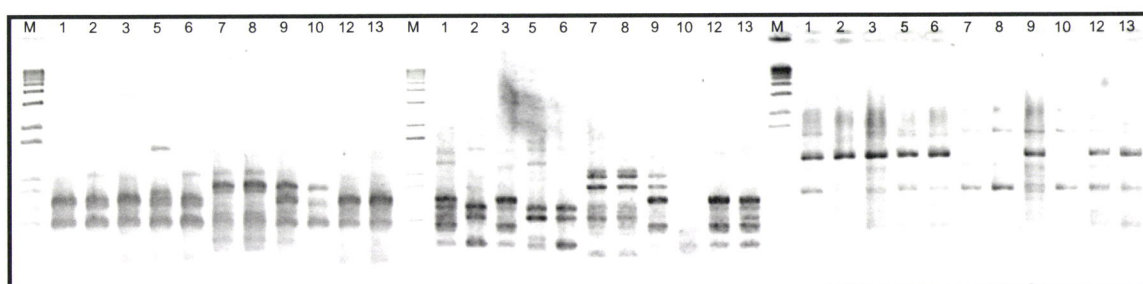


Figura 11: Gel de amplificação por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR (da esquerda para a direita).

M: Marcador 1 kb Plus (Invitrogene); **1 a 13,** número dos isolados identificados como *P. savastanoi*.

Contudo, aumentando a amostragem, verifica-se um maior poder discriminante destas técnicas.

Utilizando o programa BioNumerics foram analisados os perfis de 'fingerprinting' obtidos para todos os isolados identificados como *P. savastanoi*. Os dendrogramas construídos para cada uma das técnicas utilizando o coeficiente Pearson e o método de aglomeração UPGMA (média aritmética não ponderada), revelam que é possível formar 'clusters' bem definidos.

Em cada uma das técnicas incluíram-se réplicas de isolados escolhidos aleatoriamente, representando 10% da amostragem total. Para cada um dos isolados foram efectuadas três reacções de PCR independentes de forma a avaliar a reprodutibilidade de cada técnica. A análise dos três dendrogramas correspondentes às réplicas (10% da amostragem) permitiu determinar a reprodutibilidade de cada uma das técnicas, ou seja, o valor de semelhança médio, a partir do qual duas réplicas são consideradas iguais. Para BOX-PCR obtêm-se 80,7%, para ERIC-PCR 70,5%, para REP-PCR 76,5% e para as três técnicas em conjunto 72,7%. Estabeleceu-se assim o nível médio mínimo de 75% para a análise dos 'clusters' formados em cada dendrograma obtido.

A análise dos dendrogramas individuais para cada técnica permitiu verificar se as relações entre as estirpes de um determinado 'cluster' se mantêm ou se alteram quando é aplicada outra técnica de tipificação. Os dendrogramas obtidos a partir dos perfis de BOX-PCR e ERIC-PCR revelaram que a maioria dos 'clusters' são coesos, independentemente da técnica utilizada. Por outro lado, quando se aplica a técnica de REP-PCR verificou-se uma maior dispersão dos isolados no dendrograma obtido. Deste modo pode concluir-se acerca do maior poder discriminante de REP-PCR relativamente os isolados testados. Não foram incluídos os perfis únicos, não agrupados em 'clusters'.

Os perfis obtidos para as três técnicas foram analisados em conjunto através de um dendrograma global (Figura 12). Apesar de demonstrada a existência das sequências repetidas BOX, ERIC e REP no genoma dos isolados testados, não foi no entanto possível obter perfis característicos para o estabelecimento de raças fisiológicas devido ao elevado potencial de diferenciação verificado.

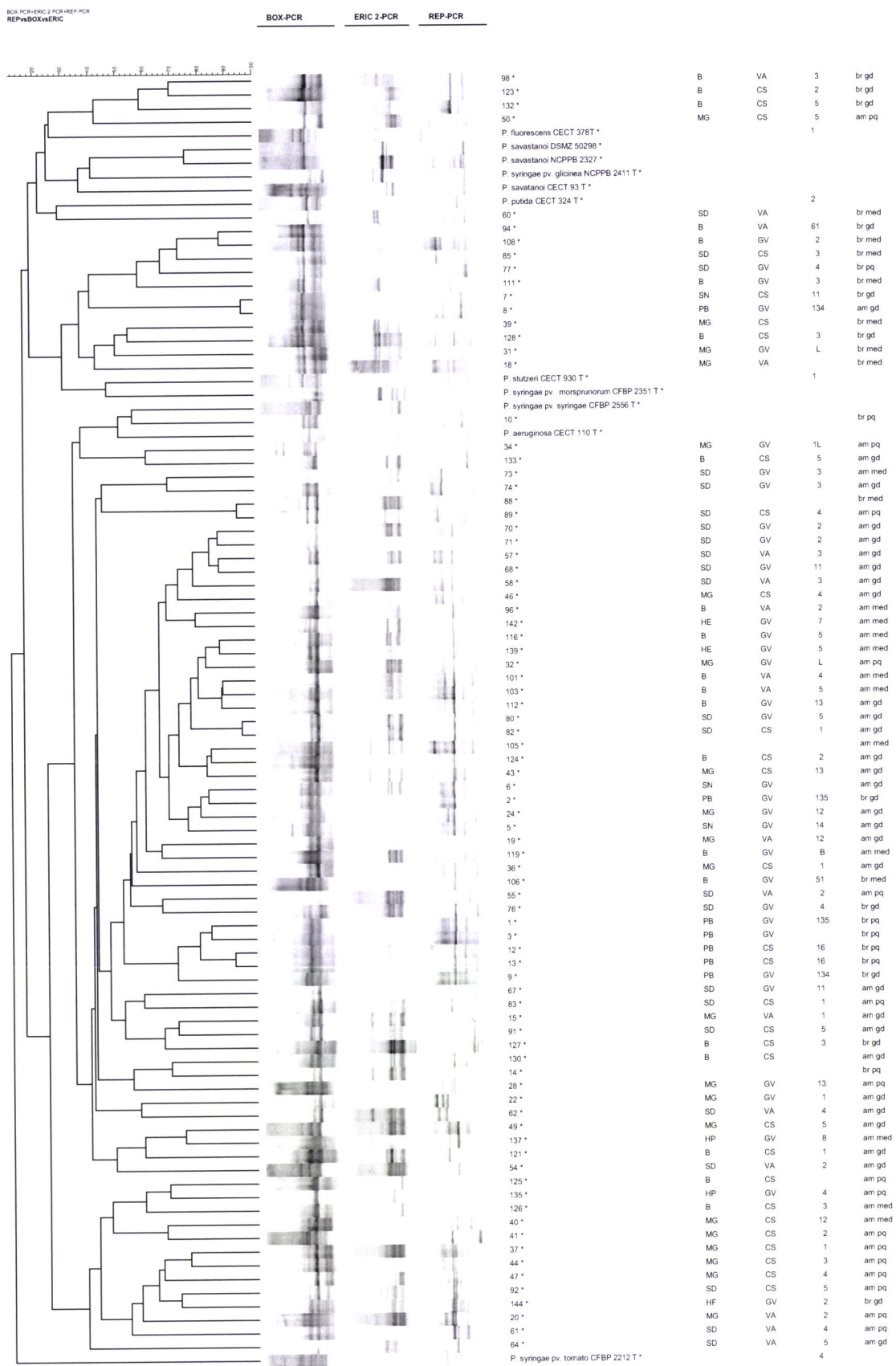


Figura 12: Dendrograma Global obtido a partir dos perfis de BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR.

A partir de todos os dendrogramas obtidos, construiu-se uma tabela (Tabela 8) de modo a resumir a análise efectuada para cada um deles, salientando o número de ‘clusters’ formados, o nível de semelhança do agrupamento dos isolados nestes ‘clusters’, e aos isolados pertencentes a cada um deles.

Tabela 8. Análise de dados relativa aos dendrogramas obtidos com ênfase no número de ‘clusters’ formados, nível de semelhança dos agrupamentos e isolados agrupados.

Dendrograma	‘Clusters’ (nº de isolados)	% semelhança	Isolados
BOX-PCR (79 isolados)	B I (2)	83,1	50, 132
	B II (30)	76,8	36, 43, 133, 130, 127, 14, 22, 58, 62, 80, 82, 67, 68, 70, 101, 46, 57, 83, 15, 139, 116, 71, 96, 103, 105, 112, 124, 19, 32, 142
	B III (12)	75,2	12, 13, 1, 6, 2, 3, 24, 73, 74, 88, 89, 91
	B IV (5)	82,5	119, 121, 137, 49, 5
	B V (2)	89,3	55, <i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> CFBP 2351 ^T
	B VI (2)	87,1	98, 123
	B VII (2)	93,9	<i>P. savastanoi</i> DSMZ 50298 ^I , <i>P. savastanoi</i> NCPB 2327
	B VIII (4)	83,8	18, 85, 31, 77
	B IX (3)	88,3	108, 111, 94
	B X (5)	80,9	7, 8, 9, 39, 128
	B XI (2)	92,6	61, 144
	B XII (8)	76,6	47, 64, 125, 126, 135, 37, 44, 40
	B XIII (2)	80,1	60, <i>P. aeruginosa</i> CECT 110 ^T
ERIC-PCR (65 isolados)	E I (3)	80	20, 37, 144
	E II (2)	83	92, 135
	E III (9)	84,6	32, 58, 6, 116, 130, 49, 76, 127, 139
	E IV (2)	81,7	62, 137
	E V (6)	82,4	80, 133, 82, 14, 15, 142
	E VI (7)	83,6	19, 24, 2, 70, 112, 101, 103
	E VII (7)	82,7	57, 83, 46, 71, 67, 68, 124
	E VIII (4)	81,7	40, 41, 96, 73
	E IX (2)	84,7	47, 50

	E X (2)	94	125, 126
	E XI (2)	88,9	<i>P. aeruginosa</i> CECT 110 ^T , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> CFBP 2556 ^T
	E XII (6)	80,2	12, 13, 3, 9, 1, <i>P. savastanoi</i> NCPB 2327
	E XIII (4)	89,4	55, 88, 54, 89
	E XIV (4)	75,9	31, 128, 39, 60
	E XV (5)	80,5	77, 85, 94, 108, 111
REP-PCR (56 isolados)	R I (2)	81,7	91, 127
	R II (2)	75,4	67, 135
	R III (2)	77,4	73, 74
	R IV (11)	76,2	116, 112, 103, 2, 3, 64, 96, 124, 43, 132, 1
	R V (4)	78,7	36, 76, 32, 139
	R VI (5)	79,1	80, 82, 49, 98, 123
	R VII (8)	76,5	6, 5, 13, 106, 70, 111, 24, 9
	R VIII (4)	76,4	68, 71, 57, 58
	R IX (3)	75,7	54, 137, 126
	R X (2)	92,7	14, 28
	R XI (2)	83,2	92, 144
	R XII (3)	76,2	37, 44, 20
	R XIII (3)	84,6	8, 10, 7
	R XIV (3)	75,2	88, 89, 85
	R XV (3)	79,6	60, <i>P. savastanoi</i> CECT 93, <i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> NCPPB 2411 ^T
	R XVI (3)	84,5	34, 133, 77
GLOBAL (23 isolados)	G I (2)	75,3	<i>P. savastanoi</i> DSMZ 50298 ^I , <i>P. savastanoi</i> NCPB 2327
	G II (2)	87,7	94, 108
	G III (2)	95,6	7, 8
	G IV (2)	93,7	88, 89
	G V (5)	77,4	70, 71, 57, 68, 58
	G VI (4)	76,5	103, 112, 80, 82
	G VII (4)	75,3	6, 2, 24, 5
	G VIII (4)	79,3	1, 3, 12, 13
	G IX (2)	75,3	37, 44

NOTA: Os isolados a cores encontram-se no mesmo grupo, quando são aplicadas diferentes técnicas.

Verificou-se que o número de ‘clusters’ obtidos para cada uma das técnicas foi sensivelmente o mesmo (13 ‘clusters’ para BOX-PCR, 15 ‘clusters’ para ERIC-PCR e 16 ‘clusters’ para REP-PCR), variando no entanto o número de representantes em cada um dos grupos (entre 2 e 30). Relativamente aos grupos obtidos a partir do dendrograma global, verificou-se que apesar de em todos se encontrarem isolados que mantêm uma relação entre si, outros isolados relacionados surgem noutra ‘cluster’.

Para avaliar a diversidade neste estudo, com base não só no número isolados presente em cada ‘cluster’, mas também na proporção com que estes isolados se distribuem pelos diferentes ‘clusters’, foram aplicados os índices de Shannon e de Simpson a cada dendrograma. Neste caso o índice de Shannon mede a incerteza associada à previsão do ‘cluster’ a que um determinado isolado pertence, enquanto que o índice de Simpson dá um valor da probabilidade de dois isolados escolhidos aleatoriamente pertencerem ao mesmo ‘cluster’. Os valores obtidos encontram-se na tabela seguinte (Tabela 9).

Tabela 9. Índices de diversidade obtidos para os quatro dendrogramas construídos.

Dendrograma	Índice de Shannon	Índice de Simpson
BOX-PCR	0,8	0,8
ERIC-PCR	1,0	0,9
REP-PCR	0,9	0,9
GLOBAL	1,0	0,9

Através dos valores obtidos para os índices aplicados, verifica-se uma distribuição equitativa dos isolados pelos diferentes ‘clusters’ para todos os dendrogramas, uma vez que tendem para o valor máximo (1) e, portanto, a existência de níveis elevados de diversidade genómica intra-específica.

Devido ao elevado índice de diversidade obtido para todos os dendrogramas não foi possível estabelecer correlação entre os isolados e a variedade de oliveira de onde foram recolhidos, nem com a região de origem.

De todos os ensaios realizados até este momento, é razoável extrair duas conclusões: em primeiro lugar existe uma grande incoerência nos métodos de identificação propostos, o que não permite assegurar a identificação dos isolados como *P. savastanoi*, mas também não permite excluí-los; em segundo lugar, os isolados em estudo, provenientes da mesma espécie de hospedeiro, apresentam uma grande heterogeneidade fenotípica e genómica.

Apesar de se ter iniciado este estudo na convicção de estar a analisar uma colecção de isolados de *P. savastanoi*, é legítimo considerar a possibilidade de ter na colecção isolados de outras espécies, ou mesmo de outros géneros. Deste modo foram seleccionados alguns representantes para aplicação de outros testes moleculares elucidativos.

8. Sequenciação do rDNA 16S de alguns isolados e construção de uma árvore filogenética

A análise dos resultados obtidos por PCR-RFLPs do rDNA 16S revelou existir variabilidade ao nível dos locais de restrição reconhecidos pela enzima *HaeIII*. Estes resultados conduziram ao agrupamento dos isolados em três grupos, correspondentes a três perfis de restrição diferentes. Por outro lado, os resultados obtidos na caracterização fenética (fenotípica e genómica) mostraram igualmente existir uma elevada heterogeneidade na colecção dos isolados estudados. Assim, optou-se pela sequenciação e análise das sequências do rDNA 16S, como método potencialmente identificativo quer a nível de género, quer a nível de espécie.

A vasta colecção de sequências, actualmente disponíveis nas bases de dados para estudos de homologia, faz da sequenciação uma das metodologias mais importantes, fiáveis, expeditas e actuais. O gene de rRNA 16S, para além de ser um excelente marcador molecular, encontra um elevado número de representantes nas bases de dados de sequências procariotas, sendo escolhido por excelência para estudos de identificação.

Assumindo que os isolados utilizados nos testes fenotípicos, de identificação e de avaliação da diversidade genómica presuntivamente identificados como *P. savastanoi*, de facto pertencem a esta espécie e dada a heterogeneidade fenética obtida, procedeu-se à sequenciação parcial do rDNA 16S de 11 isolados de forma a tentar elucidar os resultados obtidos até agora. Estes isolados foram escolhidos com base

em características fenotípicas, perfis de PCR-RFLPS 16S e distribuição nos 'clusters' obtidos por avaliação da diversidade genómica.

A análise de homologia das sequências parciais do rDNA 16S alinhadas para cada um dos 14 isolados, bem como da estirpe de referência *P. savastanoi* CECT 93, foi feita através de BLASTn (Atshul et al., 1997), na base de dados GenBank, no site da NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os resultados obtidos revelam que os isolados, 2, 6, 10, 57, 68, 88, 101 e 142, pertencem à espécie *Pantoea agglomerans*, os isolados 37 e 92 pertencem à espécie *Pantoea oleae*, os isolados 7, 85 e 128, à espécie *Erwinia toletana*, sendo o isolado 60 o único identificado como *Pseudomonas savastanoi*.

Os níveis de homologia determinados entre a sequência de cada isolado e a sequência da espécie a que pertencem (Figura 13) foram obtidos a partir do alinhamento com as sequências das estirpes de referência *P. agglomerans* ATCC 27155, *P. oleae* ATCC 33243, *E. toletana* ATCC 700880 e *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ATCC 1352^T, disponíveis na base de dados NCBI. Esta análise permitiu verificar que os níveis de homologia entre as sequências dos isolados e as sequências da espécie a que pertencem variam entre 98% e 99% em todos os casos, excepto para os isolados 57 e 142 com 95% de homologia com *P. agglomerans*. Verifica-se ainda que a homologia entre a sequência de *P. savastanoi* e as restantes espécies pode variar entre 82 e 89%, e que relativamente a estas a maior homologia (94-98%) se verifica entre *P. agglomerans* e *E. toletana*. Este resultado é coerente com o facto de várias espécies de *Erwinia* terem sido reclassificadas e incluídas no género *Pantoea*, com base em análises filogenéticas obtidas a partir de sequências de rDNA 16S (Rojas et al., 2004).

Com base na análise dos resultados obtidos por sequenciação dos isolados, procedeu-se à construção de uma árvore filogenética, onde se incluíram as estirpes de referência utilizadas nesse estudo. Foram incluídas ainda estirpes de referência de diferentes espécies, nomeadamente, *P. aeruginosa* CFBP 2466, *P. fluorescens* CFBP 2102, *P. putida* CFBP 2006, *P. syringae* pv. *glycinea* CFBP 2214, *P. syringae* pv. *morsprunorum* CFBP 2351, *P. syringae* pv. *tomato* CFBP 2212, *P. syringae* pv. *syringae* CFBP 1392 e *P. stutzeri* CFBP 2443. A construção da árvore filogenética teve como objectivo perceber as relações dos isolados com as espécies a que pertencem, bem como as relações filogenéticas entre as diferentes espécies em estudo, tendo sido utilizada *Legionella pneumophila* ATCC 33215 como 'outgroup'.

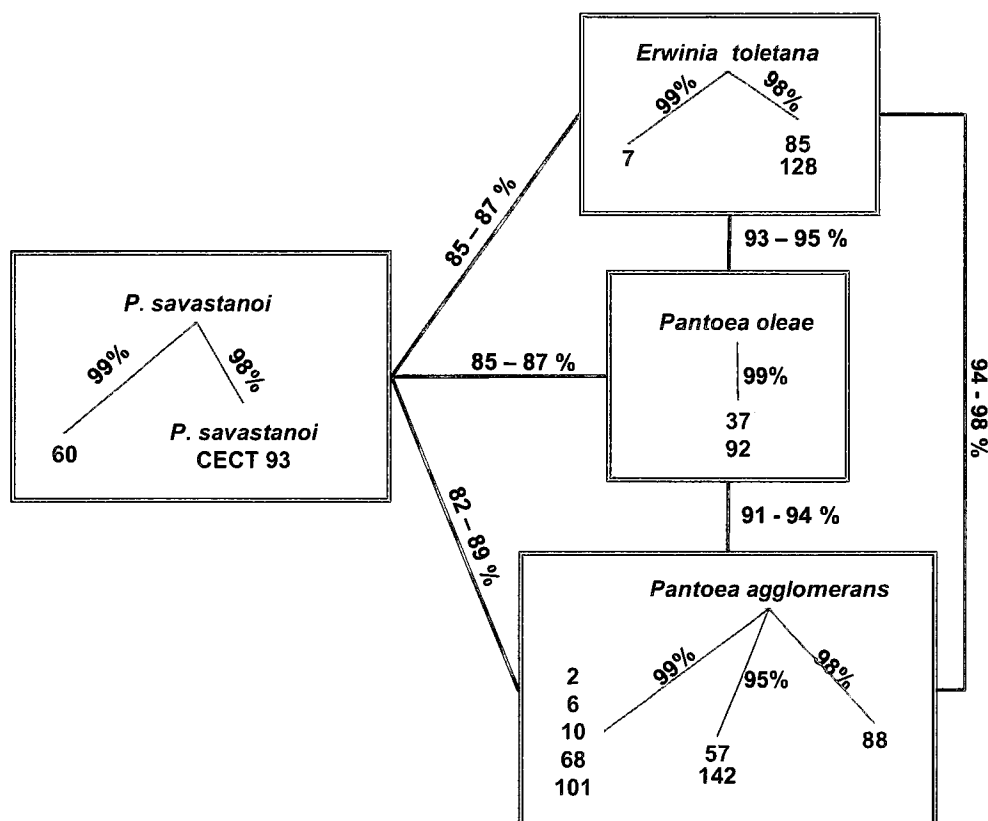


Figura 13: Esquema representativo da percentagem de homologia com base em sequências rDNA 16S. (#: número de identificação do isolado)

Os métodos de inferência filogenética baseados na análise de DNA, RNA ou proteínas permitem estudar a evolução e taxonomia dos organismos. Geralmente, as relações filogenéticas entre os organismos são representadas sob a forma de árvore. Cada árvore apresenta uma topologia característica, representativa das relações filogenéticas dos organismos em estudo e requer a existência de sequências homólogas suficientemente representativas para análise. No entanto, a árvore filogenética originada pelas sequências de um determinado gene, ou famílias de genes, não representa obrigatoriamente a árvore filogenética dos *taxa* correspondentes (Nei & Kumar, 2000).

Existem vários modelos estatísticos utilizados na construção de árvores filogenéticas, sendo os mais comuns: (i) 'Neighbour joining' e (ii) Máxima parcimónia (Nei & Kumar, 2000).

(ii) – Método de distância - 'Neighbour joining'

Neste método são calculadas as distâncias para cada um dos pares de *taxa*. Após a junção de dois 'neighbours' (vizinhos), estes passam a constituir um *taxa* único, sendo-lhe adicionado o mais próximo, e assim sucessivamente. A árvore é construída por junção sucessiva dos vizinhos mais próximos. Sempre que houver uma divergência na sequência, associada provavelmente a um fenómeno de especiação, dá-se uma bifurcação do ramo correspondente, que se designa por nó. A confiança assumida em cada nó pode ser verificada por um teste de 'bootstrap', de forma a verificar a verosimilhança da árvore obtida.

(ii) – Método da máxima parcimónia

Este método procura encontrar a árvore com a topologia mais parcimoniosa, que seja compatível com o menor número de substituições num determinado conjunto de sequências, assumindo, no entanto, que qualquer substituição de base ou aminoácido é possível. O menor número de substituições que explicam o processo evolutivo completo é escolhido, sendo o procedimento repetido para todas as árvores que apresentem uma topologia correcta.

A análise da filogenia obtida com as sequências parciais do rDNA 16S dos isolados e das sequências das estirpes de referência, utilizando o método de distância 'neighbour joining' (Figura 14), permitiu confirmar a identificação dos isolados sequenciados e, consequentemente, determinar sua afiliação filogenética. Os isolados pertencentes a cada uma das espécies dentro dos diferentes géneros ficam todos agrupados no mesmo ramo filogenético. A árvore sem raiz construída agrupa o isolado de *P. savastanoi* com todos os patovares de *P. syringae* e coloca as outras espécies de *Pseudomonas* num outro grupo próximo. Do mesmo modo, os isolados de *P. oleae* encontram-se todos no mesmo grupo, o mesmo se verificando para *P. agglomerans* e *E. toletana*. Estas três espécies relacionam-se filogeneticamente entre si, afastando-se dos grupos formados pelas diferentes espécies de *Pseudomonas*. A relação mais próxima entre *P. agglomerans* e *E. toletana* já tinha sido prevista pela análise de homologia, confirmando-se assim essa previsão.

Com base na homologia das sequências parciais rDNA 16S dos isolados e das estirpes de referência foi construída outra árvore filogenética (Figura 14) utilizando o método da máxima parcimónia. A árvore obtida foi muito idêntica à árvore obtida com o método de distância 'neighbour joining'. No entanto, como este método contabiliza o menor número de substituições que explicam o processo evolutivo completo, a distância dos ramos dos géneros envolvidos na análise anterior relativamente ao 'outgroup' *L. pneumophila* é indicativa dos fenómenos evolutivos que ocorreram até agora. Assim sendo, *P. agglomerans*, *P. oleae* e *E. toletana* parecem ter sofrido uma evolução mais rápida do que as espécies de *Pseudomonas*.

A identificação de 14 isolados por sequenciação do gene de rRNA16S, exceptuando o isolado 60, contraria os resultados obtidos na identificação presuntiva dos isolados como *P. savastanoi* por PCR-RFLPs e Nested-PCR. Tendo em conta estes resultados e a diversidade fenética encontrada, procedeu-se a uma análise dos resultados obtidos até então.

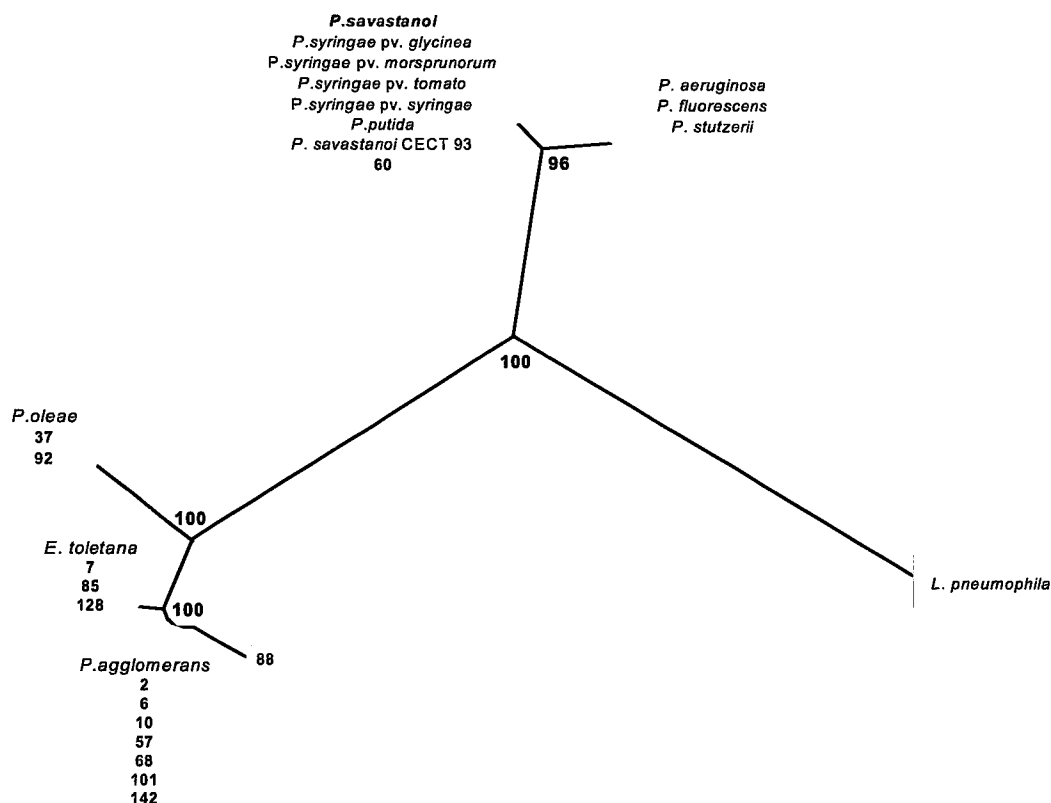


Figura 14: Árvore filogenética construída com base nas sequências parciais de rDNA 16S dos isolados e de estirpes de referência da base de dados NCBI, utilizando o método de 'neighbour joining'.

9. Análise de resultados face à sequenciação do gene rDNA 16S

Os resultados obtidos por sequenciação do gene do rDNA 16S de 14 isolados permitiram fazer uma análise dos resultados obtidos por métodos utilizados anteriormente.

Através da identificação fenotípica (referida no ponto 1) obtida para os isolados sequenciados é possível verificar que existem não só diferenças entre isolados que pertencem à mesma espécie, mas também entre estes e a estirpe de referência da espécie a que pertencem, excepto para os isolados identificados como *P. oleae*, para os quais não foi incluída estirpe de referência (Tabela 10). Apesar da variabilidade fenotípica obtida para as quatro espécies pertencentes a três géneros distintos (*Pseudomonas*, *Pantoea* e *Erwinia*), verifica-se que os testes das actividades das enzimas catalase e aminopeptidase originam resultados positivos em todas elas. No entanto, estes resultados só permitem concluir que são microrganismos Gram-negativos aeróbios ou microaerofílicos. Como já foi referido anteriormente, a fluorescência não serve como método de identificação e a actividade da enzima oxidase varia consoante a espécie.

Tabela 10. Testes fenotípicos dos isolados identificados por sequenciação e das estirpes de referência a que pertencem.

AMOSTRA	TIPO DE COLÓNIA	CATALASE	OXIDASE	AMINOPEPTIDASE	FLUORESCÊNCIA MEIO F	FLUORESCÊNCIA MEIO P
<i>P. savastanoi</i> DSMZ 50298 ^T	Branca pq	+	-	+	-	salmão
60 SD VA4	Branca med	+	+	+	-	-
<i>P. agglomerans</i>	Amarela med	+	+	+	-	salmão
2 PB 35 GV1	Branca gd	+	-	+	-	-
6 SN3 CS1	Amarela gd	+	-	+	-	-
10 SN2 CS9	Branca pq	+	+	+	salmão	-
57 SD VA3	Amarela gd	+	+	+	-	-
68 SD GV1	Amarela gd	+	+	+	-	-
88 SD CS4	Amarela gd	+	+	+	-	-
37 MG CS1	Amarela pq	+	+	+	-	-
92 SD CS5	Amarela pq	+	-	+	-	-
<i>E. toletana</i>	Branca med	+	+	+	-	salmão
7 SN1 CS1	Branca gd	+	-	+	-	salmão
85 SD CS3	Branca med	+	+	+	-	salmão
128 B CS3	Branca gd	+	+	+	salmão	-

No que se refere à restrição do produto do rDNA 16S amplificado por PCR (referido no ponto 4) para identificação de *Pseudomonas (sensu strictu)*, obtiveram-se três perfis para os isolados testados. No entanto todos eles diferentes entre si e distintos do perfil obtido para as estirpes de referência. Tendo em conta os resultados da sequenciação do rDNA 16S pode-se prever que o perfil II corresponde a isolados de *Erwinia toletana*, o perfil III a isolados de *Pantoea oleae* e o perfil IV a isolados de *Pantoea agglomerans*, uma vez que cada perfil inclui isolados identificados por este método; dois isolados do perfil II, um isolado do perfil III e três isolados do perfil IV. Com base nesta previsão fez-se um estudo teórico de restrição das sequências de rDNA 16S das estirpes de referência referidas no ponto 8, utilizando o software WebCuter (Tabela 11). Todas as sequências utilizadas entre 1105 e 1510 bp correspondem à dimensão dos fragmentos amplificados para os isolados estudados.

Tabela 11. Perfis de restrição do gene rDNA 16S de estirpes de referência utilizadas no estudo de sequenciação.

Perfil de restrição rDNA 16S	Dimensão dos fragmentos obtidos	Estirpes de referência
I	682 bp, 220 bp e 171 bp, 163 bp, 145 bp, 59 bp, 34 bp, 19 bp, 9 bp	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ATCC 1352 ^T
II	317 bp, 219 bp, 180 bp, 160 bp, 136 bp, 59 bp, 34 bp	<i>Erwinia toletana</i> ATCC 700880
III	317 bp, 278 bp, 204 bp, 180 bp, 167 bp, 162 bp, 136 bp, 34 bp, 32 bp	<i>Pantoea oleae</i> ATCC 33243
IV	317 bp, 278 bp, 180 bp, 161 bp, 151 bp, 137 bp, 35 bp, 34 bp	<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC 27155

Verifica-se deste modo que os perfis obtidos para os isolados encaixam nos perfis obtidos para as estirpes de referência tendo em conta a gama de fragmentos entre os 682 bp e os 136 bp, uma vez que a resolução do gel utilizado não permitiu separar correctamente fragmentos de dimensão muito próxima, nem visualizar fragmentos de menor dimensão.

Perante os resultados referidos é previsível que os perfis obtidos permitam distinguir estirpes pertencentes a estas espécies. Estes resultados são também esclarecedores no que diz respeito à variabilidade encontrada nos isolados recorrendo a esta metodologia.

A identificação e confirmação de *P. savastanoi* por PCR-RFLPs e Nested-PCR do gene *iaaL* (referida nos pontos 5 e 6) originaram resultados positivos para espécies pertencentes a outros géneros, nomeadamente para todos os isolados identificados por sequenciação. A falta de fiabilidade destas técnicas baseadas em PCR utilizadas para identificação de *P. savastanoi* ficou assim demonstrada. Este fenómeno não deixa de ser curioso, dado que Penyalver *et al.*, (2000) afirmam que a sequência do gene *iaaL* de *P. savastanoi* não apresenta homologia com nenhuma outra sequência disponível nas bases de dados.

Deste modo, não é surpreendente a variabilidade genómica obtida para todos os isolados presuntivamente identificados como *P. savastanoi* (referida no ponto 7), tendo em conta que foi feita a análise de variabilidade não de uma, mas de pelo menos quatro espécies diferentes. Ainda assim, através da análise dos 'clusters' formados para cada uma das técnicas, é possível tirar alguma informação face a este aspecto.

A análise do dendrograma de BOX-PCR revela que cinco dos sete isolados de *P. agglomerans* se encontram no 'cluster' B II, bem como quatro dos treze isolados incluídos no perfil IV por PCR-RFLPS do rDNA 16S. Um outro 'cluster' muito próximo deste inclui os outros dois isolados desta espécie e também três dos oito isolados incluídos no perfil III por PCR-RFLPS do rDNA 16S. Do mesmo modo, os dois isolados de *P. oleae* estão incluídos em 'clusters' próximos, nomeadamente nos 'cluster' B XI e B XII. Neste último 'cluster' incluem-se também dois dos isolados incluídos no perfil III por PCR-RFLPS do rDNA 16S. Os três isolados de *E. toletana*, bem como os nove isolados incluídos no perfil II por PCR-RFLPS do rDNA 16S, encontram-se em 'clusters' próximos, nomeadamente, B VIII, B IX e B X.

A análise do dendrograma de ERIC-PCR originou resultados idênticos aos obtidos por BOX-PCR. Os isolados de *P. agglomerans* encontram-se distribuídos pelos 'clusters' E III, E IV, E V, E VI, E VII e E VIII, bem como a maioria dos isolados incluídos no perfil IV por PCR-RFLPS do rDNA 16S. Nos 'clusters' E I e E II encontram-se dois isolados de *P. oleae*, bem como dois dos isolados incluídos no perfil III por PCR-RFLPS do rDNA 16S. Os três isolados de *E. toletana*, bem como os nove isolados incluídos no perfil II por PCR-RFLPS do rDNA 16S, encontram-se em 'clusters' próximos,

nomeadamente, E XIV e E XIV. No primeiro 'cluster' está também único isolado de *P. savastanoi*.

A análise do dendrograma de REP-PCR revelou o maior poder discriminante desta técnica relativamente a BOX-PCR e ERIC-PCR. Deste modo, os isolados das quatro espécies encontram-se dispersos pelos vários 'clusters'. No entanto, o isolado de *P. savastanoi* encontra-se no 'cluster' R V juntamente com uma estirpe de referência desta espécie, associado a um outro 'cluster' onde se encontram outras duas estirpes de referência de *P. savastanoi*.

A análise do dendrograma global para as três técnicas revela resultados semelhantes à análise dos dendrogramas em separado. Os isolados de *P. oleae* ficam agrupados em 'clusters' próximos, tal como acontece com os isolados *P. agglomerans* e de *E. toletana*. O isolado de *P. savastanoi*, tal como as estirpes de referência desta espécie, encontram-se num 'cluster' afastado dos restantes.

A abordagem polifásica aplicada neste estudo não permitiu identificar e caracterizar isolados de *P. savastanoi*, contudo, permitiu compreender os resultados obtidos face à identificação dos isolados por sequenciação.



IV – Considerações finais

IV – Considerações finais e Perspectivas

A importância agroeconómica da Fitopatologia faz com que esta área de estudo seja muito aliciante. A criação de programas de melhoramento baseia-se nos mecanismos de resistência das plantas face ao ataque por fitoparasitas e o conhecimento profundo destes agentes é crucial para o delineamento da estratégia de melhoramento a ser utilizada.

A co-evolução dos hospedeiros e dos seus patogéneos torna infrutíferos quaisquer métodos não integrados, ou seja, que não consideram o patossistema como um todo no processo de infecção. A introdução de culturas resistentes impulsionará os seus fitoparasitas a uma rápida adaptação, tornando inviável a médio/longo prazo a aplicação desta estratégia de melhoramento.

A doença dos nódulos da oliveira causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tem actualmente um grande impacto nesta cultura. Uma vez que Portugal é um dos maiores produtores mundiais de azeite, o estudo desta doença é de extrema importância, bem como o desenvolvimento de estratégias que permitam manter e melhorar os olivais portugueses. Para além do mais, cada variedade de oliveira confere características próprias ao produto final que ficariam comprometidas com a cultura exclusiva de variedades resistentes.

Uma vez que as pseudomonas são indiscutivelmente o grupo de bactérias mais diverso e ecologicamente significativa (Godfrey *et al*, 2001), a heterogeneidade fenotípica obtida neste estudo era previsível, não tendo sido possível obter identificação a nível de espécie. Existem várias publicações que referem este facto, inclusivamente espécies distantes de *Pseudomonas* apresentando fenótipos de doença semelhantes.

O estudo da produção de ácido indoleacético *in vitro*, que está relacionado com a patogenicidade em *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, permitiu verificar que para todos os isolados testados (excepto um) se detectaram diferentes níveis de produção desta fitohormona. No entanto, uma vez que não se estudou a via pela qual este composto é produzido, os resultados obtidos são apenas indicativos e não determinantes a nível de espécie. Dado que os isolados foram obtidos de nódulos de oliveira, sem dúvida locais de infecção, pode-se presumir que pertencem à espécie *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

A identificação de *Pseudomonas* (*sensu stricto*) por PCR-RFLPs do rDNA 16S revelou três perfis distintos nos quais se agrupam os isolados testados, sendo, no entanto,

todos eles diferentes do perfil característico apresentado pelas estirpes de referência de *Pseudomonas (sensu stricto)*. A variabilidade intrínseca obtida para a população de isolados testados foi claramente superior à esperada para membros da mesma espécie.

Devido ao insucesso na identificação, utilizando as metodologias referidas anteriormente, recorreu-se à detecção do gene *iaaL* por PCR-RFLPs, dado esta metodologia estar descrita como sendo eficaz na identificação de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* e discriminante relativamente a outras bactérias (Penyalver *et al.*, 2000). O baixo número de resultados positivos recorrendo a DNA total para amplificação do gene *iaaL* dos isolados previamente seleccionados através de caracterização fenotípica e a controvérsia da localização cromossomal ou plasmídica deste gene (Penyalver *et al.*, 2000; Glickman *et al.*, 1998; Glass & Kusage, 1988; Surico *et al.*, 1985; Comai & Kosuge, 1983), conduziu à utilização de DNA plasmídico para amplificação do referido gene.

Deste modo foi possível obter um maior número de resultados positivos, inclusivamente em isolados para os quais não se tinha obtido amplificação anteriormente. Nos isolados para os quais se obteve amplificação a partir de DNA plasmídico assumiu-se que a localização do gene é plasmídica, sendo cromossomal para os restantes isolados.

Devido ao baixo número de identificações obtidas utilizando esta metodologia recorreu-se a Nested-PCR na identificação e confirmação dos isolados. A aplicação desta técnica aumentou a sensibilidade na amplificação do gene *iaaL*, tendo-se obtido um elevado número de identificações, bem como a confirmação dos isolados previamente identificados. No entanto, uma vez que para todas as estirpes de referência se obteve amplificação por PCR-RFLPs ou por Nested-PCR, levanta-se a questão preocupante relativamente à fiabilidade das identificações obtidas e a hipótese de que estas técnicas não serem suficientemente fidedignas na identificação dos isolados.

Assim, perante os resultados obtidos, foram seleccionados os isolados identificados presuntivamente como *P. savastanoi* pv. *savastanoi* para serem submetidos a um estudo de variabilidade genómica.

Os perfis de 'fingerprinting' obtidos através da amplificação das sequências repetidas ao longo do genoma bacteriano por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR revelaram um elevado poder de diferenciação, tendo-se obtido índices de diversidade elevados nestas três técnicas. No entanto, estes resultados não permitiram definir raças

fisiológicas correlacionáveis com a variedade, a herdade e/ou a região de recolha das amostras.

De acordo com a análise polifásica efectuada foi possível concluir que existe uma incoerência nos métodos de identificação propostos por diferentes autores e aplicados neste trabalho, o que não permitiu assegurar a identificação dos isolados como *P. savastanoi* pv. *savastanoi* nem permitiu excluí-los deste grupo, e que os isolados em estudo apresentam uma grande heterogeneidade fenética (fenotípica e genómica).

Várias espécies de *Pseudomonas* têm sido descritas e muitas espécies continuam a ser identificadas por métodos que vão sendo revistos à medida que a tecnologia baseada em DNA vai avançando, principalmente no que diz respeito a hibridação DNA/DNA, análise de sequências de genes de rRNA 16S e pesquisa de outros genes. Estes métodos por um lado têm vindo a ajudar na taxonomia, mas, por outro lado, podem introduzir discrepância entre a análise fenotípica e genotípica (Godfrey *et al.*, 2001).

Tendo como principal objectivo confirmar a identificação dos isolados utilizados ao longo do trabalho e compreender a heterogeneidade fenética obtida, foram seleccionados alguns representantes para sequenciação parcial do gene de rRNA 16S. A análise de homologia das sequências parciais obtidas, alinhadas através de Blastn (Atschul *et al.*, 1997), no site da NCBI, revelaram que oito isolados pertencem à espécie *Pantoea agglomerans*, dois isolados pertencem à espécie *Pantoea oleae*, três isolados pertencem à espécie *Erwinia toletana* e apenas um único isolado foi identificado como *Pseudomonas savastanoi*.

A análise da filogenia, com as sequências do gene de rRNA 16S dos isolados e das estirpes de referência pertencentes aos géneros *Pantoea*, *Erwinia* e *Pseudomonas*, permitiu confirmar a identificação dos isolados sequenciados e determinar a sua afiliação filogenética. Verificou-se que os isolados pertencentes a cada uma das espécies dentro dos diferentes géneros ficam todos agrupados no mesmo ramo filogenético. No entanto, as relações filogenéticas inferidas poderiam ser diferentes se tivesse sido utilizado outro gene na análise.

Após a identificação fidedigna dos isolados por sequenciação parcial do gene de rRNA 16S, verificou-se que existem diferenças fenotípicas entre isolados pertencentes à mesma espécie e entre estes e a estirpe de referência respectiva, reforçando mais uma vez a dificuldade em obter uma identificação a nível de espécie utilizando testes fenotípicos. No entanto, os resultados obtidos por PCR-RFLPS do gene rRNA 16S tornaram-se elucidativos, uma vez que os três perfis diferentes obtidos para os

isolados estudados e distintos do perfil obtido para as estirpes de *Pseudomonas* de referência correspondem às espécies identificadas por sequenciação: *Pantoea agglomerans*, *Pantoea oleae* e *Erwinia toletana*. Estes perfis foram confirmados através de um estudo teórico utilizando estirpes de referência.

A falta de fiabilidade das técnicas de PCR-RFLPs e Nested-PCR do gene *iaaL* na identificação de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ficou também comprovada, dado que se obteve produto de amplificação não só para as estirpes de referência utilizadas como também para os isolados identificados por sequenciação.

Tendo em consideração todos os factos mencionados, não é surpreendente a variabilidade genómica obtida para os isolados incluídos na análise de 'fingerprinting' por PCR utilizando os 'primers' BOX, ERIC e REP. Deste modo, os isolados de *P. oleae* ficam agrupados em 'clusters' próximos, tal como acontece com os isolados *P. agglomerans* e de *E. toletana*. O isolado de *P. savastanoi*, tal como as estirpes de referência desta espécie encontram-se num 'cluster' afastado dos restantes.

A abordagem polifásica aplicada neste estudo não permitiu identificar nem definir raças fisiológicas de *P. savastanoi*, que constituía o principal objectivo deste trabalho. Contudo, permitiu compreender os resultados obtidos face à identificação dos isolados por sequenciação. Estes resultados poderão servir como ponto de partida em trabalhos futuros nos quais se utilizem as espécies que foram identificadas no presente trabalho.

Futuramente deverão ser seleccionados os isolados identificados por sequenciação do gene de rRNA 16S para sequenciação do gene *iaaL* e comparação das sequências obtidas nas bases de dados disponíveis. Muitos dos estudos de análise de sequências, incluindo da região rDNA 16S, não podem contabilizar a aquisição de genes nem de elementos genéticos acessórios tais como plasmídeos, transposões e fagos por transferência lateral, mutações espontâneas e recombinação, sendo que todos estes processos são importantes fontes de evolução e diversidade de espécies em bactérias (Godfrey *et al*, 2001).

O gene *iaaL* não se encontra descrito em outras espécies de bactérias. No entanto, nos casos em que se considerou que a localização deste gene é plasmídica, tem que se levar em consideração a possibilidade de ocorrer a aquisição do plasmídeo no qual se encontram os genes responsáveis pela produção de IAA, nomeadamente o gene *iaaL*, por outras espécies de bactérias oportunistas como *Pantoea agglomerans* e *Erwinia toletana* detectadas em nódulos de oliveira. Considerando a possibilidade de aquisição desse gene pelas espécies referidas levanta-se a questão de

Pantoea agglomerans e *Erwinia toletana* poderem ser responsáveis pelo aparecimento dos nódulos, uma vez que está claramente demonstrada a relação entre este gene e a patogenicidade e que foi detectado o gene *iaaL* em isolados destas espécies. Mais ainda, o aparecimento dos nódulos pode dever-se à presença em simultâneo de *P. savastanoi*, *Pantoea agglomerans* e *Erwinia toletana*, embora as duas últimas espécies estejam descritas como não patogénicas, oportunistas e com capacidade de colonização epifítica e endofítica (Rojas *et al.*, 2004; Sabaratnam & Bettie, 2003).

De forma a compreender pelo menos parcialmente o mecanismo de infecção seria necessário realizar testes de patogenicidade com cada uma das espécies isoladas e em simultâneo.



V – Referências bibliográficas

V – Referências Bibliográficas

Agrios G. N. (1997). How Plants Defend Themselves Against Pathogens. *Plant Pathology*, 4th Edition, (pp 93-112). Academic Press, USA.

Almonacid S., Quintero N., Martinez M. & Vela M. (2000). Determination of Quality Parameters of Bacterium Inocula Based on Formulation Elaborated With Strains Producing Indoleacetic Acid (IAA). www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/almonacid.pdf

Alvarez F., García de los Rios J. E., Jiménez P., Rojas A. M., Reche P. & Troya M. T. (1998). Phenotypic variability in different strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* isolated from different hosts. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 603-609.

Baker B., Zambryski P., Staskawicz B. & Dinesh-Kumar S. P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, **276**: 726-733.

Bender C. L., Alarcón-Chaidez F. & Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phyto toxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63** (2): 267-285.

Bertolini E., Olmos A., López M. M. & Cambra M. (2003). Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology*, **93** (3): 286-292.

Bertolini E., Penyalver R., García A., Olmos A., Quesada J. M., Cambra M. & López M. M. (2002). Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *Journal of Microbiological Methods*, **52** (2002): 261-266.

Brosch R., Lefèvre M, Grimont F. & Grimont P. A. D. (1996). Taxonomic diversity of pseudomonads revealed by computer-interpretation of ribotyping data. *Systematic Applied Microbiology*, **19**: 541-555.

Collmer A., Lindeberg M., Petnicki-Ocwieja T., Schneider D. J. & Alfano J. R. (2003). Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends in Microbiology*, **10** (10): 462-469.

Comai L. & Kosuge T. (1980). Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, **143** (2): 950-957.

Comai L. & Kosuge T. (1983). Transposable element that causes mutations in a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. *Journal of Bacteriology*, **154** (3): 1162-1167.

Correia I. S. (2000). *Pseudomonadaceae*. *Pseudomonas*. In: Lidel (Eds), Microbiologia, Vol 2 (pp 123-135). Lisboa.

De Bruijn F. J. (1992). Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (7): 2180-2187.

De Wit J. G. M. (2002). On guard. *Nature*, **416**: 801-803.

- Ercolani, G. L.** (1993). Comparison of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* from olive leaves and knots. *Letters in Applied Microbiology*, **16**: 199-202.
- Flor H. H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**: 275-296.
- Gardan L., Bollet C., Abu Ghorrah M., Grimont F. & Grimont P. A. D.** (1992). DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 606-612.
- Gardan L.; Shafik H.; Belouni S.; Grimont F. & Grimont P. A. D.** (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**: 469-478.
- Garrity G. M., Bell J. A. & Lilburn T.** (2005). Family *Pseudomonadaceae*. In: Brenner Don J., Krieg N. R. & Staley J. T. (Eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 2nd Edition, Vol II Part B (pp 323-379). Springer, USA.
- Gemas V.J.V., Rijo-Johansen, M. J. Tenreiro, R. & Fevereiro, P.** (2000). Inter and intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique. *The Journal of Plant Horticulture Science and Biotechnology*, **75** (3): 312-319.
- Gerhardt P., Murray R. G. E., Costilow R. N., Nester E. W., Wood W. A., Krieg N. R. & Philips g. B.** (1981). *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington.
- Glass N. L. & Kosuge T.** (1980). Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, **143** (2): 950-957.
- Glass N. L. & Kosuge T.** (1983). Transposable element that causes mutations in a plant pathogenic *Pseudomonas* sp.. *Journal of Bacteriology*, **154** (3): 1162-1167.
- Glass N. L. & Kosuge T.** (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*, **26**: 309-320.
- Glass N. L. & Kosuge T.** (1986). Cloning of the Gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, **166** (2): 598-603.
- Glass N. L. & Kosuge T.** (1988). Role of indoleacetic acid-lysine synthetase in regulation of indoleacetic acid pool size and virulence of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, **170** (5): 2367-2373.
- Glickmann E., Gardan L., Jacquet S., Hussain S., Elasri M., Petit A. & Dessaux Y.** (1998). Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11** (2): 156-162.
- Goldberg J. B.** (2000). *Pseudomonas*: Global bacteria. *Trends in Microbiology*, **8** (2): 55-57.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. & Williams S. T.** (1994). Gram-Negative Aerobic/microaerophilic Rods and Cocci. In: Brenner Don J., Krieg N. R. & Staley J. T. (Eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition, Vol II (pp 93-156). Springer, USA.

- Iacobellis N. S., Sisto A. & Surico G. (1993).** Occurrence of unusual strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* in olive in central Italy. *EPPO Bulletin*, **23**: 429-435.
- Johnsen K., Andersen S. & Jacobsen C. S. (1996).** Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (10): 3818-3825.
- Keen N. T. (1990).** Gene-for-Gene Complementary in Plant-Pathogen Interactions. *Annual Review Genetics*, **2**: 447-463.
- Kobayachi D. Y., Tamakai S. J. & Keen N. T. (1989).** Cloned avirulence genes from the tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* confer cultivar specificity on soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 157-161.
- Leitão L., Duque A. S. & Fevereiro P. (1997).** In vitro culture of portuguese varieties of *Olea europaea* L. Some Aims and Results. *Olivae*, **66**: 54-55.
- Louws F. J., Fulbright D. W., Stephens C. T. & DE Bruijn F. J. (1994).** Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, July 1994: 2286-2295.
- Luderer R. & Joosten H. A. J. (2001).** Avirulence proteins of plant pathogens: determinants of victory and defeat. *Molecular Plant Pathology*, **2**(6): 205-216.
- Maidak B. L., Olsen G. J., Larsen N., Overbeek R., McCaughey M. J. & Woese C. R. (1996).** The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acids Research*, **24**: 82-85.
- Manceau C. & Horvais A. (1997).** Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on rRNA operons with special emphasis on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (2): 498-505.
- Marques A., Corbière R., Gardan L., Tourte C. & Manceau C. (2000).** Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 715-734.
- Massol-Deya A.A., Odelson, D. A.A, Hickey, R. F. and Tiedge, J. M. (1995).** Bacterial community fingerprinting of amplified 16S-23S ribosomal gene sequences and restriction endonucleases analysis (ARDRA). In: Akkermans A. D. L., van-Elsas J. D., de-Bruijn F. J. (Eds.). *Molecular Microbial Ecology Methods*, (pp 1-8). Kluwer Academic Publishing, Boston.
- Muyzer G., Hottentrager S., Teske A. & Wawer C. (1996).** Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans A. D. L., van-Elsas J. D., de-Bruijn F. J. (Eds.). *Molecular Microbial Ecology Methods*, (pp 1-8). Kluwer Academic Publishing, Boston.
- Nei M. & Kumer S. (2000).** *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nieto C., Fernández-Tresguerres E., Sánchez N., Vicente M. & Díaz R. (1990).** Cloning vectors, derived from a naturally occurring plasmid of *Pseudomonas savastanoi*, specifically tailored for genetic manipulations in *Pseudomonas*. *Gene*, **87**: 145-149.

- Palleroni N. J.** (1993). *Pseudomonas* classification: A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*, **64**: 231-251.
- Palleroni N. J.** (2005). Genus *Pseudomonas*. In: Brenner Don J., Krieg N. R. & Staley J. T. (Eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 2nd Edition. Vol II, Part B (pp 323-379). Springer, USA.
- Panagopoulos C. G.** (1993). Olive knot disease in Greece. *EPPO Bulletin*, **23**: 417-442.
- Patten C. L. & Glick** (2000). Isolation and characterization of indoleacetic acid biosynthesis genes from plant growth-promoting bacteria. www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/patten.pdf
- Penyalver R., Garcia A., Ferrer A., Bertolini E. & Lopez M. M.** (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (6): 2673-2677.
- Pitcher D., Saunders N. & Owen** (1989). Rapid extraction of bacterial DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, **8**: 151-156.
- Roberto F. F., Klee H., White F., Norden R. & Kosuge T.** (1990). Expression and fine structure of the gene encoding N-(indole-3-acetyl)-L-lysine syntetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 5797-5801.
- Rojas A. M., García de los Ríos J. E., Fischer-Le Saux M., Jiménez P., Reche P., Bonneau S., Sutra L., Mathieu-Daudé F. & McClelland M.** (2004). *Erwinia toletana* sp. nov., associated with *Pseudomonas savastanoi*-induced tree knots. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **54**: 2217-2222.
- Sabaratnam S. & Beattie G. A.** (2003). Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728A and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (2): 1220-1228.
- Sambrook J. & Russel D. W.** (2001). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep. *Molecular Cloning*, Vol I (pp1.32-1.34). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saunier M., Malandrin L. & Samson R.** (1996). Distribution of *Pseudomonas syringae* pathovars into twenty-three O serogroups. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (7): 2360-2374.
- Schaad N. W., Vidaver A. K., Lacy G. H., Rudolf K. & Jones J. B.** (2000). Evaluation of proposed amended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. *Phytopathology*, **90** (3): 208-213.
- Schroth M. N., Hilderbrand D. C. & Panopoulos N.** (1991). Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. In: Trupper, H. G. (Eds), *The Prokaryotes – A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol III :162 (pp 3104-3131).
- Scortichini M., Rossi M. P. & Salerno M.** (2004). Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant Pathology*, **53**: 491-497.
- Silverstone S., Gilchrist D. G., Bostock R. M. & Kosuge T.** (1993). The 73-kb pIAA plasmid increases competitive fitness of *Pseudomonas syringae* subspecies *savastanoi* in oleander. *Can. J. Microbiol.*, **39**: 659-664.

- Sisto A.** Cipriani M. G. & Morea M. (2004). Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is *hrp*-dependent. *Phytopathology*, **94** (5): 484-489.
- Spiers A. J.,** Buckling A. & Rainey P. B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, **146**: 2345-2350.
- Stakawicz B. J.,** Dahlbeck D. & Keen N. T. (1984). Cloned avirulence genes from the tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* . **81**: 6024-6028.
- Surico G. &** Lavermicocca P. (1989). A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytopathology*, **79** (2): 185-190.
- Surico G.** Iacobellis N. S. & Sisto A. (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological and Plant Pathology*, **26**: 309-320.
- White T.,** Burns T., Lee S. & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*, (pp 315-322). Academic Press.
- Widmer F.,** Seidler R. J., Gillevet P. M., Watrud L. S. & Giovanni G. D. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (*Sensu Stricto*) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (7): 2545-2553.
- Yamamoto S.,** Kasai H., Arnold D. L., Jackson R. W., Vivian A. & Harayama S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from de nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, **146**: 2385-2394.
- Young J.M.** (2004). Olive Knot and its pathogens. *Australian Plant Pathology*, **33**: 33-39.
- Young M. J. &** Triggs C. M. (1994). Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. *Journal of Applied Bacteriology*, **77** (2): 195-207.
- Zilhão I.** (2005). Molecular, plastidial and mitochondrial polymorphisms in Portuguese olive cultivars. Tese de doutoramento. Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa.



Anexos

Tabela A I. Resultados de testes fenotípicos para todos os isolados identificados como *P. savastanoi*.

AMOSTRA		TIPO	CATALASE	OXIDASE	AMINOPEPTIDASE	FLUORESCÊNCIA	FLUORESCÊNCIA
		DE COLÔNIA				MEIO F	MEIO P
1	PB 35 GV1	Branca pq	+	-	+	salmão	salmão
2	PB 35 GV1	Branca gd	+	-	+	-	-
3	PB 37 GV2	Branca pq	+	+	+	-	-
5	SN4 GV1	Amarela gd	+	-	+	-	-
6	SN3 CS1	Amarela gd	+	-	+	-	-
7	SN1 CS1	Branca gd	+	-	+	-	salmão
8	PB 34 GV1	Amarela gd	+	-	+	-	-
9	PB 34 GV1	Branca pq	+	-	+	-	-
10	SN2 CS9	Branca pq	+	+	+	salmão	-
12	SN2 CS6	Branca pq	+	-	+	salmão	salmão
13	SN2 CS6	Branca pq	+	+	+	-	-
14	SN2 CS6	Branca pq	+	+	+	-	-
15	MG V1	Amarela gd	+	-	+	-	-
18	MG V2	Branca med	+	-	+	-	salmão
19	MG V2	Amarela gd	+	-	+	-	-
20	MG V2	Amarela pq	+	+	+	-	-
22	MG GV1	Amarela gd	+	-	+	-	-
24	MG GV2	Amarela gd	+	+	+	-	-
26	MG GV2	Branca med	+	-	+	-	-
28	MG GV3	Amarela pq	+	+	+	-	-
31	MG GVL	Branca med	+	-	+	salmão	salmão
32	MG GVL	Amarela pq	+	-	+	-	-
34	MG GVL	Amarela pq	+	+	+	-	-
36	MG CS1	Amarela gd	+	+	+	-	-
37	MG CS1	Amarela pq	+	+	+	-	-
39	MG CS2	Branca med	+	-	+	salmão	salmão
40	MG CS2	Amarela med	+	-	+	-	-
41	MG CS2	Amarela pq	+	-	+	-	-
43	MG CS3	Amarela gd	+	-	+	-	-
44	MG CS3	Amarela pq	+	-	+	-	-
46	MG CS4	Amarela gd	+	-	+	-	-
47	MG CS4	Amarela pq	+	-	+	-	-
49	MG CS5	Amarela gd	+	-	+	-	-
50	MG CS5	Amarela pq	+	-	+	-	-
54	SD VA2	Amarela gd	+	+	+	-	-
55	SD VA2	Amarela pq	+	-	+	-	-
57	SD VA3	Amarela gd	+	+	+	-	-
58	SD VA3	Amarela gd	+	-	+	-	-
60	SD VA4	Branca med	+	+	+	-	-
61	SD VA4	Amarela pq	+	-	+	-	-
62	SD VA4	Amarela gd	+	+	+	-	-
64	SD VA5	Amarela gd	+	+	+	-	-
67	SD GV1	Amarela gd	+	-	+	-	-

68	SD GV1	Amarela gd	+	+	+	-	-
70	SD GV2	Amarela gd	+	+	+	-	-
71	SD GV2	Amarela gd	+	+	+	-	-
73	SD GV3	Amarela med	+	+	+	-	-
74	SD GV3	Amarela gd	+	+	+	-	-
76	SD GV4	Branca gd	+	+	+	salmão	salmão
77	SD GV4	Branca pq	+	+	+	-	-
80	SD GV5	Amarela gd	+	+	+	-	-
82	SD GV5	Amarela gd	+	+	+	-	-
83	SD CS1	Amarela pq	+	+	+	-	-
85	SD CS3	Branca med	+	+	+	-	salmão
88	SD CS4	Amarela gd	+	+	+	-	-
89	SD CS4	Amarela pq	+	+	+	-	-
91	SD CS5	Amarela gd	+	-	+	-	-
92	SD CS5	Amarela pq	+	-	+	-	-
94	B VA1	Branca gd	+	-	+	-	salmão
96	B VA2	Amarela med	+	+	+	-	-
98	B VA3	Branca gd	+	+	+	-	-
99	B VA3	Amarela gd	+	+	+	-	-
101	B VA4	Amarela med	+	+	+	-	-
103	B VA5	Amarela med	+	+	+	-	-
105	B GV1	Amarela med	+	+	+	-	-
106	B GV1	Branca med	+	-	+	salmão	salmão
108	B GV1	Branca med	+	+	+	-	-
111	B GV3	Branca med	+	+	+	-	-
112	B GV3	Amarela gd	+	+	+	-	-
116	B GV5	Amarela med	+	-	+	-	-
119	B GVB	Amarela med	+	+	+	-	-
121	B CS1	Amarela gd	+	-	+	-	-
123	B CS2	Branca gd	+	+	+	-	salmão
124	B CS2	Amarela gd	+	-	+	-	-
125	B CS2	Amarela pq	+	+	+	-	-
126	B CS3	Amarela med	+	+	+	-	-
127	B CS3	Branca gd	+	+	+	salmão	-
128	B CS3	Branca gd	+	+	+	salmão	-
130	B CS4	Amarela gd	+	+	+	-	-
132	B CS5	Branca gd	+	+	+	-	salmão
133	B CS5	Amarela gd	+	-	+	-	-
135	HP GV4	Amarela pq	+	-	+	-	-
137	HP GV8	Amarela med	+	-	+	-	-
139	HE GV5	Amarela med	+	-	+	-	-
142	HE GV7	Amarela med	+	-	+	-	-
144	HF GV2	Branca gd	+	-	+	-	-

Tabela A II. Resultados de testes fenotípicos para todas as estirpes de referência.

ESTIRPES DE REFERENCIA	CATALASE	OXIDASE	AMINOPEPTIDASE	FLUORESCÊNCIA	FLUORESCÊNCIA
				MEIO F	MEIO P
<i>P. savastanoi</i> CECT 93 ^T	+	-	+	-	-
<i>P. savastanoi</i> DSMZ 50298 ^T	+	-	+	-	salmão
<i>P. savastanoi</i> NCPB 2327	+	-	+	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> CFBP 2556 ^T	+	+	+	+	salmão
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> NCPPB 2411 ^T	+	+	+	+	salmão
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> CFPB 2212 ^T	+	+	+	+	salmão
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> CFBP 2351 ^T	+	+	+	+	salmão
<i>P. aeruginosa</i> CECT 110 ^T	+	+	+	+	azul
<i>P. fluorescens</i> CECT 378 ^T	+	+	+	+	salmão
<i>P. putida</i> CECT 324 ^T	+	-	+	+	salmão
<i>P. stutzeri</i> CECT 930 ^T	+	-	+	salmão	salmão
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	+	+	salmão
<i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+	-	salmão
<i>Erwinia toletana</i>	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 861	-	-	+	-	-

Tabela B I. Resultados de PCR/RFLPs e Nested-PCR para todos os isolados identificados como *P. avastanoi*.

AMOSTRA		TIPO	IAAL - DNA	IAAL - DNA	IAAL - PLASMÍDEOS	IAAL - PLASMÍDEOS
		DE COLÔNIA	PCR/RFLPs	NESTED PCR	PCR/RFLPs	NESTED PCR
1	PB 35 GV1	Branca pq	+ / +	nt	+ / +	- / +
2	PB 35 GV1	Branca gd	+ / +	nt	+ / +	nt
3	PB 37 GV2	Branca pq	+ / +	nt	+ / +	nt
5	SN4 GV1	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	nt
6	SN3 CS1	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	nt
7	SN1 CS1	Branca gd	+ / +	+ / +	+ / +	nt
8	PB 34 GV1	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	nt
9	PB 34 GV1	Branca pq	+ / +	nt	-	nt
10	SN2 CS9	Branca pq	+ / +	nt	+ / +	nt
12	SN2 CS6	Branca pq	+ / +	nt	-	nt
13	SN2 CS6	Branca pq	+ / +	nt	+ / +	nt
14	SN2 CS6	Branca pq	+ / +	nt	+ / +	nt
15	MG V1	Amarela gd	-	- / +	-	- / -
18	MG V2	Branca med	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
19	MG V2	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	nt
20	MG V2	Amarela pq	+ / +	+ / +	-	- / -
22	MG GV1	Amarela gd	+ / +	+ / +	-	- / -
24	MG GV2	Amarela gd	+ / +	nt	+	+ / +
26	MG GV2	Branca med	+ / +	nt	-	- / +
28	MG GV3	Amarela pq	+ / +	nt	+	+ / +
31	MG GVL	Branca med	+ / +	+ / +	+	+ / +
32	MG GVL	Amarela pq	-	- / +	-	- / -
34	MG GVL	Amarela pq	-	- / +	+ / +	+ / +
36	MG CS1	Amarela gd	+ / +	nt	+	+ / +
37	MG CS1	Amarela pq	+ / +	nt	-	- / -
39	MG CS2	Branca med	+ / +	nt	-	- / -
40	MG CS2	Amarela med	-	- / +	+ / +	+ / +
41	MG CS2	Amarela pq	-	- / +	+ / +	+ / +
43	MG CS3	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	+ / +
44	MG CS3	Amarela pq	+ / +	nt	-	- / -
46	MG CS4	Amarela gd	+ / +	+ / +	-	- / -
47	MG CS4	Amarela pq	+ / +	+ / +	-	- / -
49	MG CS5	Amarela gd	+ / +	+ / +	-	- / -
50	MG CS5	Amarela pq	+ / +	+ / +	-	- / -
54	SD VA2	Amarela gd	-	- / +	-	- / -
55	SD VA2	Amarela pq	-	- / +	-	- / -
57	SD VA3	Amarela gd	-	- / +	-	- / +
58	SD VA3	Amarela gd	-	- / +	-	- / +
60	SD VA4	Branca med	+ / +	nt	+ / +	+ / +
61	SD VA4	Amarela pq	-	nt	+ / +	+ / +
62	SD VA4	Amarela gd	-	- / +	-	- / +
64	SD VA5	Amarela gd	+ / +	+ / +	-	- / -
67	SD GV1	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	+ / +
68	SD GV1	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	+ / +
70	SD GV2	Amarela gd	+ / +	+ / +	-	- / +

71	SD GV2	Amarela gd	+ / +	+ / +	+	+ / +
73	SD GV3	Amarela med	+ / +	+ / +	-	- / -
74	SD GV3	Amarela gd	+ / +	+ / +	-	- / -
76	SD GV4	Branca gd	-	- / +	-	- / -
77	SD GV4	Branca pq	+ / +	+ / +	-	- / +
80	SD GV5	Amarela gd	-	- / +	-	- / -
82	SD GV5	Amarela gd	-	+ / +	-	- / -
83	SD CS1	Amarela pq	-	nt	+	+ / +
85	SD CS3	Branca med	-	- / -	-	- / +
88	SD CS4	Amarela gd	-	- / +	-	- / -
89	SD CS4	Amarela pq	+ / +	+ / +	-	- / -
91	SD CS5	Amarela gd	-	- / +	-	- / -
92	SD CS5	Amarela pq	-	- / +	-	- / -
94	B VA1	Branca gd	-	nt	+ / +	+ / +
96	B VA2	Amarela med	+ / +	+ / +	-	- / -
98	B VA3	Branca gd	-	- / +	-	- / +
99	B VA3	Amarela gd	-	- / -	-	- / +
101	B VA4	Amarela med	-	- / +	-	- / -
103	B VA5	Amarela med	-	- / +	-	- / -
105	B GV1	Amarela med	-	nt	+ / +	+ / +
106	B GV1	Branca med	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
108	B GV1	Branca med	+ / +	nt	-	- / +
111	B GV3	Branca med	+ / +	nt	-	- / +
112	B GV3	Amarela gd	+ / +	nt	+ / +	+ / +
116	B GV5	Amarela med	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
119	B GVB	Amarela med	+ / +	+ / +	-	- / -
121	B CS1	Amarela gd	-	- / +	-	- / -
123	B CS2	Branca gd	+ / +	nt	+	+ / +
124	B CS2	Amarela gd	+ / +	nt	-	- / -
125	B CS2	Amarela pq	-	- / +	-	- / -
126	B CS3	Amarela med	-	- / +	-	- / +
127	B CS3	Branca gd	-	- / +	-	- / -
128	B CS3	Branca gd	+ / +	nt	+	+ / +
130	B CS4	Amarela gd	-	- / +	-	- / +
132	B CS5	Branca gd	+	+ / +	-	- / -
133	B CS5	Amarela gd	-	- / +	-	- / -
135	HP GV4	Amarela pq	-	- / -	+	+ / +
137	HP GV8	Amarela med	-	- / +	+ / +	+ / +
139	HE GV5	Amarela med	-	- / +	-	- / +
142	HE GV7	Amarela med	+	+ / +	-	- / -
144	HF GV2	Branca gd	-	-	+ / +	+ / +

nt – não testado

Tabela B II. Resultados de PCR/RFLPs e Nested-PCR para todas as estirpes de referência.

ESTIRPES DE REFERENCIA	IAAL - DNA	IAAL - DNA	IAAL - PLASMÍDEOS	IAAL - PLASMÍDEOS
	PCR/RFLPs	NESTED PCR	PCR/RFLPs	NESTED PCR
<i>P. savastanoi</i> CECT 93 ^T	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>P. savastanoi</i> DSMZ 50298 ^T	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>P. savastanoi</i> NCPB 2327	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> CFBP 2556 ^T	-	- / +	-	- / +
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> NCPB 2411 ^T	-	- / +	+	+ / +
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> CFPB 2212 ^T	-	- / +	+	+ / +
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> CFBP 2351 ^T	-	- / -	-	- / +
<i>P. aeruginosa</i> CECT 110 ^T	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>P. fluorescens</i> CECT 378 ^T	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>P. putida</i> CECT 324 ^T	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>P. stutzeri</i> CECT 930 ^T	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	- / -	+	+ / +
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	- / -	-	- / +
<i>Erwinia toletana</i>	-	- / +	-	- / +
<i>E. coli</i> ATCC 861	-	- / -	-	- / -